MICROBIOLOGIA
BÁSICA E
APLICADA
DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS
(ORGANIZADORA)
Atena
Editora
Ano 2022

MICROBIOLOGIA BÁSICA E APLICADA

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS
(ORGANIZADORA)

Atena
Editora
Ano 2022

Microbiologia básica e aplicada

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Daniela Reis Joaquim de Freitas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M626 Microbiologia básica e aplicada / Organizadora Daniela Reis Joaquim de Freitas. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5983-953-7
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.537221802

1. Microbiologia. I. Freitas, Daniela Reis Joaquim de (Organizadora). II. Título.

CDD 579

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

APRESENTAÇÃO

A pesquisa na área de Microbiologia tem se expandido de forma impressionante nos últimos anos. Seja na área de pesquisa médica, no manejo e controle de infecções, ou nas áreas de biotecnologia, nutrição, produção de alimentos, produção de medicamentos ou indústria, sempre o conhecimento a respeito de microbiologia mostra-se necessário. E é fundamental poder acompanhar este desenvolvimento, através do estudo acerca do tema. O livro “Microbiologia Básica e Aplicada” nos dá uma mostra do tipo de pesquisa que se vem fazendo atualmente na área de Microbiologia geral.

Esta obra **é** composta por trabalhos científicos produzidos em diversas regiões do país na forma de artigos originais e de revisão, por pesquisadores capacitados, e abordam desde viroses transmitidas por dípteros ceratopogonídeos, como maruins, à entomologia forense, produção de cerveja utilizando leveduras não-convencionais e infecções odontogênicas causadas por *Streptococcus* e *Staphylococcus*, ou pneumonias causadas por *Klebsiella pneumoniae*; ainda temos a produção de biossurfactante por *Cunninghamella elegans* em condições extremas; a utilização de rizobactérias para a conservação de espécies vegetais florestais como Apuleia leiocarpa; e a produção de antimicrobianos através do uso de produtos naturais.

Ao longo dos oito capítulos que compõem esta obra, serão discutidos diferentes temas, com metodologia científica embasada em conceitos teórico-científicos aprovados por pares dentro da área de Microbiologia. Além disso, o livro traz conceitos importantes, todos atualizados e revistos. Isto faz com que “Microbiologia Básica e Aplicada” seja um livro voltado principalmente para estudantes e profissionais que desejam aprofundar mais seus conhecimentos nesta maravilhosa área, através de uma leitura rápida e dinâmica.

Todas as publicações da Atena Editora passam pela revisão de um Comitê de pesquisadores com mestrado e doutorado em programas de pós-graduação renomados no Brasil. Assim, este livro aqui apresentado é a soma de esforços para realizar um trabalho de qualidade, atualizado e devidamente revisado por pares.

Esperamos que você, caro leitor, aproveite bem nossa obra. Boa leitura.

Daniela Reis Joaquim de Freitas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

MARUINS (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) VETOR DE DOENÇAS NO MUNICÍPIO DE CAXIAS-MA

Data de aceite: 01/02/2022

Cleilton Lima Franco
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Seropédica - Rio de Janeiro
https://orcid.org/0000-0003-1827-773X

Tatiane Gomes da Silva Araújo
Universidade Estadual do Maranhão, Campus Caxias
Caxias – Maranhão
http://lattes.cnpq.br/7138795945226202

Ivirlane Naira Conceição de Oliveira
Universidade Estadual do Maranhão, Campus Caxias
Caxias – Maranhão
http://lattes.cnpq.br/3168588796648063

Francisca Barbara e Silva Barros
Universidade Estadual do Maranhão, Campus Caxias
Caxias – Maranhão
https://orcid.org/0000-0002-5734-0431

Carlos Augusto Silva de Azevêdo
Universidade Estadual do Maranhão, Campus Caxias
Caxias – Maranhão
https://orcid.org/0000-0002-0503-3843

RESUMO: Os Ceratopogonideos possuem quatro fases: ovo, larva, pupa e adultos. Os adultos encontram próximos de habitats aquáticos e semiaquáticos, onde usam para se reproduzir. As fêmeas são predadoras e hematófagas, alimentam-se de sangue humano (antropofílicas) ou animais (zoofílicas), onde podem transmitir doenças, destacar o vírus da língua azul “Bluetongue”, tendo como principal vetor o *Culicoides.* O objetivo do trabalho foi inventariar os imaturos aquáticos com adultos da família Ceratopogonidae em ambientes lênticos, lóticos e por meio de criação em laboratório. Foram obtidos cerca de 800 espécimes imaturos da família Ceratopogonidae, obtidas três subfamílias, Dasyheleinae e Ceratopogoninae e Forcipomyiinae. Obteve-se 18 emergências do gênero *Culicoides*, 21 emergências *Dasyhelea* e nenhuma do gênero *Bezzia*. Das quatro subfamílias da família Ceratopogonidae encontradas para o Brasil três foram retratadas neste estudo. O conhecimento dessas espécies torna-se importante por serem potencias vetores de doenças como o vírus (OROV) importante para estudos epidemiológico.
PALAVRAS-CHAVE: Vírus, Oropouche, *Culicoides.*

MARUINS (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) VECTOR OF DISEASES IN THE CITY OF CAXIAS-MA

ABSTRACT: Ceratopogonids have four phases: egg, larva, pupa and adults. Adults are found close to aquatic and semi-aquatic habitats, where they use to reproduce. Females are predators and hematophagous, feed on human (anthropophilic) or animal (zoophilic) blood, where they can transmit diseases, highlighting the bluetongue virus “Bluetongue”, with *Culicoides* as its main vector. The objective of this work was to inventory

aquatic immatures with adults of the Ceratopogonidae family in lentic and lotic environments and through laboratory breeding. About 800 specimens of larvae of the Ceratopogonidae family were obtained, from three subfamilies, Dasyheleinae and Ceratopogoninae and Forcipomyiinae. Eighteen emergences of the genus *Culicoides*, 21 emergences of *Dasyhelea* and none of the genus *Bezzia* were obtained. Of the four subfamilies of the Ceratopogonidae family found for Brazil, three were portrayed in this study. The knowledge of these species becomes important as they are potential vectors of diseases such as the virus (OROV), which is important for epidemiological studies.
KEYWORDS: Virus, Oropouche, *Culicoides.*

1 I INTRODUÇÃO

A Ordem Diptera possui atualmente cerca de 153.000 espécies descritas em cerca de 160 famílias (Thompson, 2008). São reconhecidas no Mundo cinco subfamílias, 127 gêneros e 6.298 espécies (Borkent, 2012). Na região Neotropical, quatro (Leptoconopinae, Forcipomyiinae, Dasyheleinae e Ceratopogoninae) com cerca de 52 gêneros e 1.188 espécies, destes, 16 são cosmopolitas. No Brasil ocorrem 4 subfamílias (Ceratopogoninae, Forcipomyiinae, Dasyheleinae e Leptoconopinae), com 424 espécies e 31 gêneros. Dentre as subfamílias Ceratopogoninae é considerado o grupo mais diversos em gêneros e espécies, compondo-se de seis tribos (Borkent et al. 2009; Hamada; Ferreira- Keppler, 2012).

Os Ceratopogonideos possuem quatro fases: ovo, larva, pupa e adultos. Os adultos encontram próximos de habitats aquáticos e semiaquáticos, onde usam para se reproduzir. Possuem espécies hematófagas de humanos e animais, por isso consideradas importantes por transmitirem doenças (Borkent et al. 2009).

As larvas de Ceratopogonidae são delgadas e cilíndricas, mede de 2 a 15 mm, a cabeça é inserida no tórax (eucefálicas), a cápsula cefálica é completa e bem desenvolvida, possui peças bucais aptas para morder e mastigar e ausência de pernas torácicas, tórax com três segmentos e abdômen com nove segmentos (Tenskey, 1981; Guimarães; Amorim, 2006; Torreias; Ferreira-Keppler, 2011). Apresentando fototaxia positiva ou negativa. Não dependem da respiração atmosférica capazes de colonizar corpos de água em diferentes profundidades (Ronderos et al. 2006).

No Brasil, larva e pupa de *Culicoides insignis* Lutz e pupa de *Dasyhelea pusilla* Lutz foram encontradas em mangue, valas de rua com água, em pequenas poças d'água e em buracos (Forattini; Rabello 1957). Outros Ceratopogonídeos ocorrem em axilas de aráceas, bromélias, cana-de-açúcar, cacau, *Calathea* G. Mey e em *Nepenthes* Linn (Kitching, 2000).

Os adultos possuem cabeça móvel, olhos compostos grandes, peças bucais direcionadas ventralmente e órgão tubular de sucção nas peças bucais, pode apresentar modificações para função picadora (Gullan; Cranston, 2017). As fêmeas são predadoras e hematófagas (Laender et al., 2004), alimentam-se de sangue humano (antropofílicas)

ou animais (zoofílicas), onde podem transmitir doenças (Borkent, 2004; Ronderos et al., 2003). Em animais, pode-se destacar o vírus da língua azul “Bluetongue”, tendo como principal vetor o *Culicoides insignis* Lutz 1809, que transmite filária e o vírus a ruminantes domésticos e selvagens como bovinos, ovinos, caprinos e cervos, ocasionando sua morte ou implicações no comércio de animais e produtos de origem animal (Gorch; Larger 2001; Gorch et al., 2002; Castellón; Veras, 2015).

Espécies de *Culicoides* veiculam esporos, parasitando mamíferos arbóreos, gansos, patos domésticos e silvestres. Quanto aos nematóides, são conhecidas espécies de filárias transmitidas por espécies de *Culicoides* e *Leptoconops* cujos hospedeiros incluem anfíbios, aves e mamíferos (Borkent, 2004; Ronderos et al. 2003) entre os patógenos, estão protozoários, nematóides e vírus. *Culicoides furens* Poey e *Culicoides paraensis* Goeldi são conhecidos vetores da microfilária *Mansonella ozzardi* Manson (Buckley 1934; Shelley; Shelley 1976).

Entre os vírus, o *Oropouche* (OROV) é o mais importante agente etiológico transmitido por *C. paraensis* ao homem (Linley et al. 1983); embora não seja fatal, esta é uma enfermidade debilitante. Configurava-se, assim, de estrema relevância conhecer o vetor deste agente, o que leva a realizarem investigações de larva com obtenção de adulto deste vetor na cidade de Caxias-MA, Brasil.

2 | OBJETIVOS

Inventariar os imaturos aquáticos com adultos da família Ceratopogonidae (Diptera) de ambientes lênticos e lóticos por meio de criação em laboratório, descrevendo possíveis espécies vetores de doenças encontrados na cidade de Caxias-MA.

3 | METODOLOGIA

A Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum é considerada Patrimônio Municipal de Caxias, está localizado entre as coordenadas 04º 53’ 30’’S/43º 24’ 53”W, próximo a zona urbana da qual é separada pela BR 316 e tem aproximadamente 4.500 mil hectares. Caracteriza-se por apresentar uma vegetação decíduas em áreas da savana do Cerrado, sensu lato (Lima et al. 2016), que vai desde cerrado ralo até cerradão. São encontrados em alguns trechos bacias de acumulações de água, há diversas nascentes que formam lagoas, brejos e córregos o que facilita o aparecimento de vários riachos pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Itapecuru (Neres; Conceição, 2010; Medeiros, 2015).

A região possui um clima equatorial semi-úmido, com temperatura média anual de 28 ° C e precipitação anual de 1100 a 1800 mm, que atinge o pico na estação chuvosa (dezembro a maio), enquanto a outra metade do ano (junho a Novembro) engloba a estação

seca (Medeiros 2015).

Em cada igarapé foi demarcado um transectos de 50 metros divididos em cinco pontos de 10 metros cada. Durante as etapas de coleta, em cada igarapé foram obtidos dados como parâmetros físico-químicos e da integridade ambiental. Para as coletas dos imaturos utilizou-se de rede entomológica em D em diferentes tipos de substratos como bancos de folhas no leito, troncos e raízes submersas, pedras e macrófitas em áreas de correnteza ou remanso, de jusante para montante. Foram realizadas também coletas em fitotelmatas (*Phenakospermum* sp) através de catação manual.

Para a coleta em *Phenakospermum* sp foram selecionadas plantas acima de dois metros altura, sendo cortadas as axilas e retiradas as larvas, conservando-se 30 cm da região inferior da região axial superior das folhas para conservação da planta. O material extraído da axila foi colocado em uma bandeja plástica e lavado com um pouco de água para a retirada dos imaturos. Parte do material foi colocado em potes coletores contendo larvas vivas a serem utilizadas para a criação e outra, foi acondicionada em álcool a 80% para identificação. O material foi levado ao laboratório de Entomologia Aquática para criação. As larvas para criação foram colocadas em recipientes plásticos de poliestireno, contendo substrato do local para abrigo e alimento e favorecer seu desenvolvimento Pes et. al. (2005) e Azevêdo (2003).

A identificação dos adultos e das larvas foi realizada sob estereomicroscópio no Laboratório de Entomologia Aquática. Para examinar em nível de gênero, utilizou-se chaves especializadas para o grupo como Hamada; Ferreira- Keppler (2012), Courtney e Merritt (2008), Albertino (2012).

4 | RESULTADOS

Foram obtidos 804 espécimes imaturos da família Ceratopogonidae, obtidas três subfamílias, *Dasyheleinae* e *Ceratopogoninae* e *Forcipomyiinae.* A subfamília *Dasyheleinae* com cerca de 54 espécimes e um único gênero *Dasyhelea* (n=39), a subfamília *Ceratopogoninae,* com um número total de espécimes (n=749); com 7 gêneros *Bezzia* (n=55), *Culicoides* (n=631), *Alluaudomyia* (n=1), *Palpomyia* (n=21), *Probezzia* (n=2), *Serromyia* (n=1) e com *Sphaeromias* (n=38), *Forcipomyiinae e Forcipomyia* (n=1).

O elevado número de espécimes da subfamília Ceratopogoninae, pode estar relacionada a sua ampla distribuição, como as larvas dos gêneros *Culicoides* por estarem adaptadas a uma grande variedade de habitats e de substratos. A maior ocorrência das larvas associada ao acumulo da água na vegetação está ligado ao habitat por lhe proporcionar as larvas proteção principalmente de *Culicoides* e *Dasyhelea e* durante o período de seca as plantas oferecerem as condições ideais a sua sobrevivência.

Para a associação dos imaturos com os adultos, foram separados 147 exemplares de imaturos da família Ceratopogonidae. Destes 67 espécimes pertenciam ao gênero

Culicoides, e foram obtidas 18 emergências, em seguida foi realizada a identificação do adulto para confirmação. Do gênero *Dasyhelea* 21 indivíduos, entretanto não foi possível a emergência. Também foi realizada a criação espécimes de imaturos onde todos pertenciam ao gênero *Bezzia*, onde não foi observada nenhuma emergência deles.

Espécies de *Culicoides* e *Leptoconops* transmitem protozoários, nematóides e vírus cujos hospedeiros incluem anfíbios, aves e mamíferos (Borkent 2004; Ronderos et al. 2003). *Culicoides furens* Poey e *Culicoides paraensis* Goeldi são conhecidos vetores da microfilária *Mansonella ozzardi* Manson (Buckley 1934; Shelley; Shelley 1976).

Entre os vírus, o Oropouche (OROV) é o mais importante agente etiológico transmitido por *Culicoides.* homem, embora não seja fatal, esta é uma enfermidade debilitante. Na Amazônia, inúmeras epidemias dessa doença febril têm sido registradas em surtos urbanos nos estados do Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins (Linley et al. 1983).

5 | CONCLUSÃO

Das quatro subfamílias da família Ceratopogonidae encontradas para o Brasil três foram retratadas neste estudo Dasyheleinae, Ceratopogoninae e Forcipomyiine, podendo demonstrar que novos registros de espécies podem ser realizados. O conhecimento dessas espécies torna-se importante por serem potencias vetores de doenças como o vírus (OROV) importante para estudos epidemiológico e por serem causadores de doenças e ainda não ter sido realizado estudos para o estado do Maranhão e para Caxias.

REFERÊNCIAS

ALBERTINO, R. J. (ed.). **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia** (Eds). MELO, G.A.R.; CARVALHO, C. J. B.: CASARI, S. A., CONSTANTINO, R. Ribeirão Preto: Holos Editora,. 810p.: il.; 28. 2012.

AZEVÊDO, C. A. S. **Taxonomia e bionomia de imaturos de Megaloptera (Insecta) na Amazônia Central, Brasil.** Dissertação de Mestrado**-** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas INPA/UA. Manaus, Amazonas. 159p. 2003.

BORKENT, A. **The Biting Midges, the Ceratopogonidae**. pp, 113-126. *In*: MARQUARDT, W.C. (Ed). Biology of Disease Vectors. 2nd Edition. Elsevier Academic Press. Burlington, San Diego, London, xxiii + 785p, 2004.

BORKENT, A. **World species of Biting Midges** (Diptera: Ceratopogonidae). Available 2012. from: http://www.inhs.illinois.edu/research/ FLYTREE/CeratopogonidaeCatalog.pdf (Acesso: 27/09/2013).

BORKENT, A.; SPINELLI, G. R.; GROGAN, W. L. Ceratopogonidae (Biting Midges, Purrujas). p. 407-435. *In*: Brown, B.V.; Borkent, A.; Cumming, J.M.; Wood, D.M.; Woodley, N.E.; Zumbado, M.A. (eds.). ***Manual of Central American Diptera:*** Volume 1. NCR Research Press, Ottawa, Ontario, Canada, 714p. 2009.

BUCKLEY J. J. C. On the development, in *Culicoides furens* Poey, of *Filaria* (=*Mansonella) ozzardi* Manson, 1897. *J Helminthol 12*: 99-118. 1934.

CASTELLÓN, E. G.; VERAS, R. S., **Maruins (*Culicoides*: Ceratopogonidae) na Amazônia Brasileira**. Manaus: Editora INPA, 2015.

COURTNEY, G. W.; MERRITT, R. W. Aquatic Diptera. Part one. Larvae of aquatic Diptera, pp. 687-722. *In* MERRITT, R. W.; CUMMINS, K. W.; BERG, M. B. (eds.). **In Introduction to the Aquatic Insects of North America**. 4a edição. Kendall/Hunt Publishing Co. Dubuque, Iowa. Cap. 22, 1158p, 2008.

FORATTINI O. P, RABELLO E. X. Dados sobre *Dasyhelea* Kieffer, 1911 do Brasil (Diptera, Ceratopogonidae). **Revista Brasileira Entomologia**. 7: 241-50. 1957.

GORCH, C.; LARGER, I. Lengua azul. Actualización sobre el agente y la enfermedad. **Revista Argentina de Microbiologia,** 33: 122-132, 2001.

GORCH, C.; VAGNOZZI, A.; DUFFY, S.; MIQUET, J.; PACHECO, J.; BOLONDI, A.; DRAGHI, G.; CETRA, B.; SONI, C.; RONDEROS, M.; RUSSO, S.; RAMIREZ, V.; LAGER, I. Lengua Azul: Aislamiento y caracterizacióndel vírus e identificación de vectores em elnoreste argentino. **Revista Argentina de Microbiologia**, 34: 150-156, 2002.

GUIMARÃES, J. H.; AMORIM, D. S. 14. Diptera, p. 147- 160. In: Costa, C.; S. Ide & C. E. Simonka (Eds.), **Insetos Imaturos. Metamorfose e Identificação**. Holos, Editora, Ribeirão Preto, 2006ª.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. I**nsetos: fundamentos da entomologia, 5 ed.** Editora Roca Ltda, Rio de Janeiro, 391p, 2017.

HAMADA, N.; FERREIRA-KEPPLE, R. L. **Guia Ilustrado de Insetos Aquáticos e Semiaquáticos da Reserva Florestal Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil.** Manaus: Editora da Universidade Federal do Amazonas. 198p, 2012.

KITCHING, R. L. **Food webs and container habitats: the natural history an ecology of phytotelmata,** Cambrigde Univ. Press, Cambrigde, USA, 431p, 2000.

LAENDER, J. O.; RIBEIRO, E. S.; GOUVEIA, A. M. G.; LOBATO, Z. I. P.; FELIPPEBAUER, M. L. Levantamento das espécies de *Culicoides Latreille,* 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) encontradas nas mesorregiões norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri, Minas Gerais, Brasil**. Entomologia y Vectores**, v.11, n.1, p.145-157, 2004.

LINLEY, J. R., HOCH, A. L., PINHEIRO, F. P. Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) and Human Health **Journal of Medical Entomology,** V. 20,Issue 4, 21 July 1983, Pages 347–364, 21 July 1983.

MEDEIROS, R. N. Visões da natureza. In: SOUSA, I. G.; VIANNA, J. M.; MENESES, R.L. **Cartografias invisíveis: saberes e sentires de Caxias.** Academia caxiense de letras, Caxias. 33-34p. 2015.

NERES, L. P.; CONCEIÇÃO, G. M. Florística e fitossociologia a Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão, Brasil. **Cadernos de Geociências**, 7(2):122-130. 2010.

PES, A. M. O.; HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L. Chaves de identificação de larvas para famílias e gêneros de Trichoptera (Insecta) da Amazônia Central, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, n. 2, p. 181-204, 2005.

RONDEROS, M. M.; GRECO, N. M.; SPINELLI, G. R. Diversity of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in the area of the Yacyretá Dam Lake between- Agentina and Paraguay. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, 98 (1): 19-24. 2003.

RONDEROS, M. M.; SPINELLI, G. R.; DÍAZ, F. Observations on the immatures of *Dasyhelea necrophila* Spinelli & Rodriguez in laboratory (Diptera: Ceratopogonidae). **Transactions of the American Entomological Society**. 132 (3+4): 291-297, 2006.

SHELLEY A. J, SHELLEY A. Further evidence for the transmission of *Mansonella ozzardi* by *Simulium amazonicum* in Brazil. *Ann Trop Med Parasit 70*: 213-217. 1976.

TENSKEY, H. J. Morphology and terminology – larvae, chap. 3, p.65-88.*In*: VOCKEROTH, J. R & WOOD, D. M. (coord). **Manual of Nearctic Diptera**. Ottawa: Biosystematics Reserchs Institue, Monograph no. 27, v.1, vi+674p. [14], 1981.

THOMPSOM, F. C. **The Diptera site. The biosystematic data base of world Diptera. Nomeclator status statistics.** Version. 10.5. 2008. <http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/names/Status/bdwdstat.htm>. Acesso: 19 de jan. de 2018.

TORREIAS, S. R. S.; FERREIRA-KEPPLER, R. L. Macroinvertebrates inhabiting the tank leaf terrestrial and epiphyte bromeliads at Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** 54(6): 1193-1202. 2011.

CAPÍTULO 2

PREVALÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS E OS PERFIS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS: UMA REVISÃO

Data de aceite: 01/02/2022

Lizandra Maria Ferreira Almeida
Curso de graduação em Biomedicina, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Maria Eduarda Lima Martins
Curso de graduação em Biomedicina, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

José Manuel Noguera Bazán
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade CEUMA
Curso de graduação em Odontologia, Centro Universitários UNDB
São Luís, MA, Brasil

Erika Alves da Fonseca Amorim
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Tatiany Gomes Ferreira Fernandes
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Cícero Newton Lemos Felício Agostinho
Curso de graduação em Odontologia, Centro Universitários UNDB
São Luís, MA, Brasil

Lívia Câmara de Carvalho Galvão
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade CEUMA
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Adrielle Zagmignan
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Luís Cláudio Nascimento da Silva
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade CEUMA
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

RESUMO: As infecções odontogênicas são originadas dos tecidos dentais e podem se disseminar para outros sítios anatômicos, podendo tornar-se complexas com comprometimento das vias aéreas, sepse, necrose tecidual, endocardite, mediastinite e infecções profundas do pescoço, podendo ser potencialmente fatais. Em geral, essas infecções têm caráter polimicrobiano, e os patógenos tradicionalmente apontados como agentes etiológicos são as bactérias dos gêneros *Streptococcus* (especialmente *Streptococcus viridans*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*), *Peptostreptococci*, *Prevotella* e *Fusobacterium*. No entanto, diversos indícios têm sugerido outras espécies como patógenos emergentes. O objetivo desta pesquisa é realizar uma revisão da prevalência e perfis de resistência de patógenos envolvidos em infecções odontogênicas. A busca foi realizada nas bases de dados PubMed, sendo analisados artigos em língua inglesa e os descritores utilizados foram: “odontogenic infections”, “antibiogram” e “antimicrobial resistance”. Foram incluídos artigos que realizaram o isolamento e a determinação

da resistência/sensibilidade aos antimicrobianos dos agentes etiológicos isolados. Como esperado, a análise dos 13 artigos incluídos nesta revisão revelou que espécies do gênero *Streptococcus* configuraram como as mais predominantemente em 9 artigos. Todavia, foi possível observar que outros gêneros têm ganhado destaque como *Staphylococcus*, tendo sido apontado dentre os predominantes em 4 artigos, mesmo resultado para *Prevotella*. Os gêneros *Enterococcus* e *Fusobacterium* foram destacados em dois artigos. Outros gêneros citados entre os predominantes em pelo menos um artigo foram: *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium* e *Nesseria*. Em relação à resistência aos antimicrobianos, as drogas mais apontadas com menores eficácias foram Penicilina (5 artigos) e Clindamicina (4 artigos), seguidas por amoxicilina (3 artigos), ampicilina e eritromicina (2 artigos para ambas). É válido ressaltar que em alguns artigos foi demonstrado um elevado grau de resistência para os patógenos considerados como emergentes. Tomados em conjunto, os dados reunidos neste artigo apontam a complexidade da microbiota envolvida na patogênese das infecções odontogênicas e a crescente evolução de resistência observada nestas espécies. Estas informações são importantes para auxiliar os profissionais da odontologia na prevenção e manejo dessas infecções, além de ressaltar a importância do uso racional de fármacos.
PALAVRAS-CHAVE: Patógenos orais; Estreptococos, Estafilococcus.

ABSTRACT: Odontogenic infections are originate from dental tissues and can spread to other anatomical sites. They are classified as complex with involvement of the airways, sepsis, tissue necrosis, endocarditis, mediastinitis and deep neck infections, which can be potentially fatal. In general, these infections are polymicrobial in nature, and the pathogens traditionally identified as etiological agents are bacteria of the *Streptococcus* genera (especially Streptococcus *viridans*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*), *Peptostreptococci*, *Prevotella* and *Fusobacterium*. However, several evidences have suggested other species as emerging pathogens. The aim of this research is to review the prevalence and resistance profiles of pathogens involved in odontogenic infections. The search was carried out in the PubMed databases, with articles in English being analyzed and the descriptors used were: "odontogenic infections", "antibiogram" and "antimicrobial resistance". Articles that performed the isolation and determination of resistance/sensitivity to antimicrobial agents of the isolated etiological agents were included. As expected, the analysis of the 13 articles included in this review revealed that *Streptococcus* species were the most predominant in 9 articles. However, it was possible to observe that other genera have gained prominence such as *Staphylococcus*, having been pointed out among the predominant ones in 4 articles, the same result for *Prevotella*. The *Enterococcus* and *Fusobacterium* genera were highlighted in two articles. Other genera cited among the predominant ones in at least one article were: *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium* and *Nesseria*. Regarding antimicrobial resistance, the drugs most frequently mentioned with the lowest efficacy were Penicillin (5 articles) and Clindamycin (4 articles), followed by amoxicillin (3 articles), ampicillin and erythromycin (2 articles for both). It is worth noting that in some articles a high degree of resistance to pathogens considered to be emerging was demonstrated. Taken together, the data gathered in this article point to the complexity of the microbiota involved in the pathogenesis of odontogenic infections and the increasing

evolution of resistance observed in these species. This information is important to help dentistry professionals in the prevention and management of these infections, in addition to highlighting the importance of the rational use of drugs.
KEYWORDS: Oral pathogens; Streptococci, Staphylococci.

1 I INTRODUÇÃO

As infecções de origem odontogênica constituem um grave problema de saúde pública no Brasil e em outros países ao redor do mundo (JOHNSON; FOY; ELLINGSEN; NELSON et al., 2021; LAMENHA-LINS; CAVALCANTI-CAMPELO; CAVALCANTE-SILVA; RODRIGUES-MOTA et al., 2020; TORMES; DE BORTOLI; JUNIOR; ANDRADE, 2018). As causas mais comuns de infecções odontogênicas são cárie dentária, restaurações profundas ou falha no tratamento do canal radicular, pericoronite e doença periodontal (OGLE, 2017).

Estas infecções ocorrem em situações onde os mecanismos de defesa do hospedeiro estão deficientes, e são originadas dos tecidos dentais e de suporte podendo se disseminar para os espaços faciais subjacentes (KAKOSCHKE; EHRENFELD; MAST, 2020; OGLE, 2017). Algumas comorbidades como diabetes e cirrose hepática, podem predispor ao agravamento rápido da infecção e dificultar seu tratamento (BALI; SHARMA; GABA; KAUR et al., 2015; QU; LIANG; JIANG; QIAN et al., 2018; RIEKERT; KREPPEL; ZOLLER; ZIRK et al., 2019).

A gravidade da infecção está diretamente associada ao perfil de virulência dos patógenos envolvidos neste processo e ao nível de imunodeficiência do hospedeiro (IGOUMENAKIS; GKINIS; KOSTAKIS; MEZITIS *et al.*, 2014; KESWANI; VENKATESHWAR, 2019). Quanto maior a virulência dos microrganismos causadores deste processo, ou quanto menos eficientes os mecanismos de defesa do hospedeiro, maior a probabilidade de que o paciente desenvolva uma infecção grave (RAJENDRA SANTOSH; OGLE; WILLIAMS; WOODBINE, 2017; WEISE; NAROS; WEISE; REINERT *et al.*, 2019).

As infecções de origem odontogênica variam de abscesso periférico a infecções superficiais e profundas, levando a infecções graves na região da cabeça e pescoço (CHANDRA; RAO; MANZOOR; ARUN, 2017). Elas tornam-se complexas ao causar complicações graves, como comprometimento das vias aéreas, sepse, necrose tecidual, endocardite, mediastinite e infecções profundas do pescoço (IGOUMENAKIS; GKINIS; KOSTAKIS; MEZITIS *et al.*, 2014; OGLE, 2017; WEISE; NAROS; WEISE; REINERT *et al.*, 2019).

Em geral, a etiologia dessas infecções tem caráter polimicrobiano, envolvendo microrganismos aeróbios e anaeróbios que fazem parte da microbiota normal da cavidade oral (OGLE, 2017; ROBERTSON; SMITH, 2009; YUVARAJ, 2016). São patógenos comuns em infecções odontogênicas bactérias dos gêneros *Streptococcus* (especialmente

Streptococcus viridans, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*) *Peptostreptococci*, *Prevotella* e *Fusobacterium* (IGOUMENAKIS; GKINIS; KOSTAKIS; MEZITIS *et al.*, 2014; ROBERTSON; SMITH, 2009; YUVARAJ, 2016). Outros gêneros de bactérias aeróbias, como *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. têm sido considerados como emergentes em infecções odontogênicas e despertam preocupação devido ao elevado número de linhagens com perfis de hipervirulência e resistência a múltiplos antibióticos (BAHL; SANDHU; SINGH; SAHAI *et al.*, 2014; YUVARAJ, 2016).

Apesar das novas políticas públicas de saúde bucal focadas na prevenção, a incidência dessas infecções ainda tem aumentado nos últimos anos, visto que a higiene oral continua precária, a dieta moderna altamente cariogênica (rica em açucares e carboidratos), e o acesso ao atendimento público odontológico cada vez mais difícil (CAMARGOS; MEIRA; AGUIAR; ABDO et al., 2016). É importante ressaltar que esses tratamentos emergenciais necessitam de recursos hospitalares como internação, exames laboratoriais, equipe multidisciplinar e medicações endovenosas (CHRISTENSEN; HAN; DILLON, 2013; GAMS; SHEWALE; DEMIAN; KHALIL *et al.*, 2017). Destaca-se também o aumento de casos que necessitam de internação em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), o que torna o tratamento mais oneroso aos cofres públicos (FU; MCGOWAN; SUN; BATSTONE, 2018).

Os pacientes internados para o tratamento de infecções odontogênicas têm a qualidade de vida fortemente prejudicada nos aspectos socioeconômicos e psicológicos. Além disso, devido à complexidade do diagnóstico e tratamento, estas infecções resultam em grandes custos ao sistema público de saúde. Neste sentido, o objetivo deste estudo é realizar uma revisão do perfil de resistência aos antimicrobianos dos agentes etiológicos envolvidos em infecções odontogênicas a partir de artigos publicados entre 2018 e 2020.

2 | METODOLOGIA

O trabalho desenvolvido trata-se de um estudo exploratório realizado por meio de pesquisa bibliográfica de artigos publicados entre 2018 e 2020. A busca foi realizada nas bases de dados Pubmed e os descritores utilizados foram: “odontogenic infections”, “antibiogram” e “antimicrobial resistance”. Foram incluídos artigos baseados na leitura dos resumos que realizaram a determinação da resistência/sensibilidade aos antimicrobianos dos agentes etiológicos isolados. E os critérios de exclusão: artigos de revisão, estudos clínicos, estudos realizados com animais, artigos que não identificaram os agentes etiológicos, artigos que não realizaram avaliação da resistência/sensibilidade aos antimicrobianos.

3 | REVISÃO

3.1 Análise da prevalência de microrganismos em infecções odontogênicas e perfis de resistência aos antimicrobianos

Utilizando as palavras-chave e os critérios de inclusão/exclusão selecionados, foram selecionados 13 artigos publicados entre os anos de 2018 e 2020 (Tabela 1). Como esperado, a análise dos 13 artigos incluídos nesta revisão revelou que espécies do gênero *Streptococcus* configuraram como as mais predominantemente em 9 artigos. Todavia, foi possível observar que outros gêneros têm ganhado destaque como *Staphylococcus*, tendo sido apontado dentre os predominantes em 4 artigos, mesmo resultado para *Prevotella*. Os gêneros *Enterococcus* e *Fusobacterium* foram destacados em dois artigos. Outros gêneros citados entre os predominantes em pelo menos um artigo foram: *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium* e *Nesseria*. Em relação à resistência aos antimicrobianos, as drogas mais apontadas com menores eficácias foram Penicilina (5 artigos) e Clindamicina (4 artigos), seguidas por amoxicilina (3 artigos), ampicilina e eritromicina (2 artigos para ambas). A seguir apresentamos os principais achados destes artigos.

Local	Período do estudo	Pacientes envolvidos no estudo	Microrganismos mais prevalentes encontrados	Antibióticos com menores eficácias	Referências
Estados Unidos	2002 a 2012	131	*Streptococci* alfa-hemolíticos, *Streptococcus milleri*, *Prevotella* e *Staphylococcus* coagulase-negativo.	Clindamicina e Eritromicina	PLUM; MORTELLITI; WALSH, 2018
Austrália	2006 a 2014	185	Não detalhado à nível de espécie	Penicilina G e Amoxicilina	LIAU; HAN; BAYETTO; MAY et al., 2018
India	2013 a 2014	100	*Streptococcus* do grupo viridans, *S. aureus*, *F. nucleatum*	Penicilina e Clindamicina	
Alemanha	2012 a 2017	483	*S. viridan*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* e *Prevotella oris*	Clindamicina e Eritromicina	WEISE; NAROS; REINERT et al., 2019
Mexico	X	14	*Clostridium beijerinckii*, *Lactococcus lactis*	Dicloxacilina, Cefazolina, Clindamicina	(LOPEZ-GONZALEZ; VITALES-NOYOLA; GONZALEZ-AMARO; MENDEZ-GONZALEZ et al., 2019)
Nigéria	2014 a 2015	55	S. *aureus* e *Proteus mirabilis*	Ceftriaxona e Amoxicilina-clavulanato	(ADAMSON; ADEYEMI; GBOTOLORUN; ODUYEBO et al., 2019)

Polônia	X	52	*Actinomyces naeslundii, Actinomyces odontolyticus* e *Propionibacterium propionicum*	Ampicilina	(BOGACZ; MORAWIEC; SMIESZEK-WILCZEWSKA; JANOWSKA-BOGACZ et al., 2019)
França	2004 a 2014	653	*Streptococcus* do grupo F*, Streptococcus alfa-hemolítico* e *Streptococcus constellatus*	Gentamicina, Clindamicina, Amoxicilina-ácido clavulânico	(DELBET-DUPAS; DEVOIZE; DEPEYRE; MULLIEZ et al., 2019
Coreia do Sul	2007 a 2016	1772	*S. viridans* e *Nesseria* sp.	Penicilina G e Ampicilina	(KANG; KIM, 2019)
Índia	2012 a 2016	142	*Peptostreptococcus* e *S. viridians*	Amoxicilina	(SEBASTIAN; ANTONY; JOSE; BABU et al., 2019).
Alemanha	2012 a 2015	200	*Streptococcus, Fusobacterium, Prevotella* e *Bacteroides*	Cefuroxime e Cefoxitina	(BAUM; HA-PHUOC; MOHR, 2020)
Japão	2013	246	*Prevotella* spp. e *Streptococcus* spp	Penicillina	(KANEKO; MATSUMOTO; IWABUCHI; SATO et al., 2020
Índia	2013 a 2016	124	*Staphylococcus aureus, Enterococcus* sp. e *Streptococcus* sp.	Penicillina	(UPPADA; SINHA; 2020).

Tabela 1. Artigos publicados entre 2018 e 2020 demonstrando a prevalência de microrganismos em infecções odontogênicas e os perfis de resistência aos antimicrobianos.

Pesquisadores da Austrália analisaram retrospectivamente os dados de infecções odontogênicas internadas no Royal Adelaide Hospital durante um período de 9 anos (2006 a 2014). Um total de 672 pacientes foram atendidos no período, no entanto os dados microbiológicos estavam disponíveis para apenas 447 casos. Os autores encontraram que a maioria das infecções foram polimicrobianas; contudo, as espécies mais prevalentes não foram detalhadas na publicação. Em apenas 185 casos foram avaliados o perfil de resistência aos antimicrobianos, sendo encontrado uma taxa de microrganismos resistentes de 17,8%. Os maiores níveis de resistência foram observados para Penicilina G (10,8%) e Amoxicilina (9,7%). Os pacientes com linhagens resistentes demonstram resultados clínicos marcadamente piores (maiores tempos de internação e menores taxas de sucesso à terapia cirúrgica inicial (LIAU; HAN; BAYETTO; MAY *et al.*, 2018).

Um estudo retrospectivo foi realizado a partir de dados coletados de pacientes submetidos à drenagem de abscessos odontogênicos (n = 131) de 2002 a 2012 atendido em uma instituição acadêmica de Nova Iorque (Upstate Medical University). Os autores observaram uma maior prevalência de infecções polimicrobianas nestes pacientes (60,3%), chegando a 70% nos casos pediátricos. As bactérias mais comuns foram do gênero *Streptococcus* (66,4%), dos quais 33,6% foram do grupo dos estreptococos alfa hemolíticos e 32,1% foram classificados como *Streptococcus milleri*. Bactérias do gênero

Prevotella (16,8%) e estafilococos coagulase-negativos (14,5%) também foram prevalentes. Interessantemente, *Candida* sp. e *Morganella* spp. foram mais comuns em crianças do que em adultos, para os outros tipos de patógenos a prevalência foi igual nos dois grupos avaliados. Resistência aos antibióticos foi observada em sete patógenos diferentes, principalmente em isolados de *Morganella morganii* (100% de isolados resistentes à amplicilina e cefazolina), *Stomatococcus* (50% de isolados resistentes à clindamicina e/ou penicilina), *Lactobacillus* (33% de isolados resistentes à clindamicina e/ou penicilina), *S. miller* (35% de isolados resistentes à eritromicina; 33% à clindamicina). A resistência aos antibióticos em patógenos foi mais comum em pacientes adultos, exceto para *M. morganii* (isolada apenas em casos pediátricos) (PLUM; MORTELLITI; WALSH, 2018).

Shakya e colaboradores (2018) realizaram um estudo prospectivo de 100 casos consecutivos de infecções odontogênicas tratadas na Faculdade Governamental de Odontologia (*Government College of Dentistry*) na Índia. Nestes pacientes, a cárie foi a doença dentária mais frequente (53,27%) associada à etiologia das infecções odontogênicas, sendo o primeiro molar inferior o dente mais frequentemente acometido (41,9%). *Streptococcus* do grupo viridans (47,05%) foram os microrganismos aeróbios mais isolados, seguidos por *S. aureus* (19,60%) e *E. faecalis* (7,84%). Dentre os anaeróbios, os mais prevalentes foram *Fusobacterium nucleatum* (16,92%), *Prevotella* sp. (10,77%) e *Peptostreptococcus* sp. (7,69%). Em geral, os microrganismos aeróbios apresentaram sensibilidade os antibióticos avaliados, com exceção de Metronidazol (como esperado pelos autores). Por outro lado, penicilina apresentou baixa ação contra todas bactérias anaeróbicas, assim como clindamicina contra os isolados de *F. nucleatum* e *Prevotella* sp. (SHAKYA; SHARMA; NEWASKAR; AGRAWAL *et al.*, 2018)

Outro estudo foi realizado no México com apenas 14 pacientes identificou em média 3 isolados em cada caso de infecção odontogênica maxilofacial. As espécies mais prevalentes foram: *Clostridium beijerinckii* (37%), *Lactococcus lactis* (33,3%), *Clostridium* spp. (15%), *Streptococcus anginosus* (13,3%). Para todos os microrganismos, as menores taxas de susceptibilidade foram à dicloxacilina (5,5%), cefazolina (36%), clindamicina (47,2%), ceftriaxona (59,7%) (LOPEZ-GONZALEZ; VITALES-NOYOLA; GONZALEZ-AMARO; MENDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2019).

Adamson et al. (2019) realizaram um estudo com objetivo de isolar os microrganismos envolvidos em infecções odontogênicas em um hospital na Nigéria entre 2014 e 2015. Dos 55 casos atendidos, 42 (76,4%) resultaram em cultura positiva para bactérias. Os isolados mais prevalentes foram *S. aureus* (22%) e *Proteus mirabilis* (16%). No geral, 52% dos organismos isolados foram sensíveis a amoxicilina-clavulanato, 70% eram sensíveis a Ceftriaxona, enquanto 24% eram resistentes a ambos os antibióticos. Análises estatísticas indicaram que a Ceftriaxona foi estatisticamente mais potente na inibição do crescimento de bactérias do que amoxicilina-clavulanato (ADAMSON; ADEYEMI; GBOTOLORUN; ODUYEBO *et al.*, 2019).

Na Polônia foi conduzido um estudo comparativo sobre o perfil de suscetibilidade de bactérias isoladas de 26 pacientes com abscessos odontogênicos intraorais e aquelas obtidas de 26 indivíduos com cirurgia dentária ambulatorial. *Actinomyces naeslundii* (17 isolados), *Actinomyces odontolyticus* e *Propionibacterium propionicum* (4 isolados para ambos) foram as espécies mais isoladas. As maiores taxas de resistência foram encontradas para ampicilina (BOGACZ; MORAWIEC; SMIESZEK-WILCZEWSKA; JANOWSKA-BOGACZ *et al.*, 2019).

Uma interessente pesquisa realizada por Delbet-Dupas et al (2019) na França analisou os dados de pacientes com infecção odontogênica severa, atendidos entre 2004 e 2014. Durante este período foram registrados 653 casos, e 535 (81,9%) pacientes tiveram esfregaços coletados durante a cirurgia e 477 teve exame positivo. Em 377 destes nenhuma bactéria predominante foi isoladas (microbiota orofaríngea polimórfica), enquanto nos 100 restantes uma a três espécies bacterianas não comensais ou patogênicas foram isoladas. As bactérias mais comuns isoladas foram *Streptococcus* do grupo F (22 swabs), *Streptococcus* alfa-hemolítico (18 swabs), e *Streptococcus constellatus* (16 swabs). Em relação ao resultado do antibiograma, 78% dos isolados eram resistente à gentamicina, 36% à clindamicina e 23% resistentes ou com sensibilidade intermediária à amoxicilina-ácido clavulânico (DELBET-DUPAS; DEVOIZE; DEPEYRE; MULLIEZ *et al.*, 2019).

No trabalho de Kang e Kim. (2019) foi determinado a resistência aos antibióticos de bactérias isoladas de 1772 casos de abscessos maxilofaciais odontogênicos ocorridos entre 2007 e 2016 em um hospital na Corea do Sul. Um total de 2.489 isolados bacterianas foram obtidas (2.101 Gram-positivas e 388 Gram-negativas). *S. viridans* foi o microrganismo predominante, correspondendo a 80% dos Gram-positivos obtidos, dentre os Gram-negativos bactérias do gênero *Nesseria* se destacaram. No entanto, as mais elevadas taxas de resistência poram encontradas para *S. aureus* (frente à penicilina G e ampicilina) e *Klebsiella pneumoniae* (frente à ampicilina) (KANG; KIM, 2019).

Uma pesquisa realizada na Índia analisou amostras de 142 pacientes com infecções do espaço fascial de cabeça e pescoço de origem odontogênica entre 2012 e 2016. Destes, 17 amostras eram estéreis e dos 125 casos restantes o organismo aeróbio mais comumente isolado foi *S. viridians* (34,49%), enquanto o gênero anaeróbio mais comum foi *Peptostreptococcus* (61,11%). Os autores destacam uma alta taxa de resistência à amoxicilina em todos os isolados obtidos (96,55%), e correlacionaram com o uso empírico desta droga (SEBASTIAN; ANTONY; JOSE; BABU *et al.*, 2019). Já em outro estudo reallizado com 124 pacientes, provenientes da zona rural da Índia, com infecção do espaço orofacial de origem odontogênica, os microrganismos mais isolados foram *Staphylococcus aureus* (43,7%), seguido por espécies de *Enterococcus* (22.9%) e *Streptococcus* (18.7%). Os autores destacam que vários microrganismos isolados neste estudo mostraram resistência à penicilina (UPPADA; SINHA, 2020).

Weise e colaboradores realizaram um estudo retrospectivo com pacientes que

necessitaram de internação hospitalar devido a infecções odontogênicas com progressão para sepse. A pesquisada ocorreu entre 2012 e 2017 no Hospital Universitário de Tuebingen (Alemanha). Do total de 483 pacientes, 16 tiveram progressão para sepse. Os swabs intraoperatórios destes indivíduos demonstraram um espectro polimicrobiano aeróbio e anaeróbio típico de bactérias orais, especialmente anaeróbios e estreptococos, principalmente *S. viridans* (75%) seguido por *S. epidermidis* (38%), *E. faecalis* (31%) e *Prevotella oris* (31%). As maiores taxas de resistência foram observadas para Clindamicina e Eritromicina (WEISE; NAROS; WEISE; REINERT *et al.*, 2019).

Outro estudo conduzido na Alemanha abordou diversos aspectos relacionados à eficácia do tratamento de infecções odontogênicas. Foram analisados 200 casos ocorridos durante 2012 a 2015. O exame microbiológico foi para 70 casos, com predominância de espécies de *Streptococcus* (27%), *Fusobacterium* (19%), *Prevotella* (16%) e *Bacteroides* (14%). Os antibíoticos com menores eficácias foram Cefuroxime e Cefoxitin (BAUM; HA-PHUOC; MOHR, 2020). Posteriormente, outro estudo realizado na Alemanha apontou para uma elevada taxa de resistência de espécies de *Streptococcus*, destacando-se a resistência à clindamicina (HEIM; JURGENSEN; KRAMER; WIEDEMEYER, 2021).

Kaneko et al. (2020) reportaram o primeiro estudo no Japão de vigilância de susceptibilidade antimicrobiana de isolados recuperados de infecções odontogênicas. O estudo incluiu 51 instituições e 246 amostras. Os gêneros predominantemente identificados nestas amostras foram *Prevotella* spp. e *Streptococcus* spp. Os isolados de *Prevotella* spp. apresentaram marcante resistência à penicilinas e cefemas. Foram também encontradas cepas de *Prevotella* resistentes aos macrolídeos, quinolonas e clindamicina (KANEKO; MATSUMOTO; IWABUCHI; SATO *et al.*, 2020).

4 | CONCLUSÃO

Em síntese, os dados analisados nestes estudos confirmam que as espécies do gênero *Streptococcus* configuraram como as mais predominantemente. Todavia, foi possível observar a importância de outros gêneros como *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Enterococcus* e *Fusobacterium*. Em relação à resistência aos antimicrobianos, as drogas mais apontadas com menores eficácias foram Penicilina e Clindamicina. É válido ressaltar que em alguns artigos foi demonstrado um elevado grau de resistência para os patógenos considerados como emergentes.

Tomados em conjunto, os dados reunidos neste artigo apontam a complexidade da microbiota envolvida na patogênese das infecções odontogênicas e a crescente evolução de resistência observada nestas espécies. Estas informações são importantes para auxiliar os profissionais da odontologia na prevenção e manejo dessas infecções, além de ressaltar a importância do uso racional de fármacos.

REFERÊNCIAS

ADAMSON, O. O.; ADEYEMI, M. O.; GBOTOLORUN, O. M.; ODUYEBO, O. O. *et al.* Comparison of sensitivity of bacteria isolated in odontogenic infections to ceftriaxone and amoxicillin-clavulanate. **Afr Health Sci**, 19, n. 3, p. 2414-2420, Sep 2019.

BAHL, R.; SANDHU, S.; SINGH, K.; SAHAI, N. *et al.* Odontogenic infections: Microbiology and management. **Contemp Clin Dent**, 5, n. 3, p. 307-311, Jul 2014.

BALI, R. K.; SHARMA, P.; GABA, S.; KAUR, A. *et al.* A review of complications of odontogenic infections. **Natl J Maxillofac Surg**, 6, n. 2, p. 136-143, Jul-Dec 2015.

BAUM, S. H.; HA-PHUOC, A. K.; MOHR, C. Treatment of odontogenic abscesses: comparison of primary and secondary removal of the odontogenic focus and antibiotic therapy. **Oral Maxillofac Surg**, 24, n. 2, p. 163-172, Jun 2020.

BOGACZ, M.; MORAWIEC, T.; SMIESZEK-WILCZEWSKA, J.; JANOWSKA-BOGACZ, K. *et al.* Evaluation of Drug Susceptibility of Microorganisms in Odontogenic Inflammations and Dental Surgery Procedures Performed on an Outpatient Basis. **Biomed Res Int**, 2019, p. 2010453, 2019.

CAMARGOS, F. d. M.; MEIRA, H. C.; AGUIAR, E. G. d.; ABDO, E. N. *et al.* Infecções odontogênicas complexas e seu perfil epidemiológico. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, 16, n. 2, p. 25-30, 2016.

CHANDRA, H. J.; RAO, B. S.; MANZOOR, A. M.; ARUN, A. Characterization and antibiotic sensitivity profile of bacteria in orofacial abscesses of odontogenic origin. **Journal of maxillofacial and oral surgery**, 16, n. 4, p. 445-452, 2017.

CHRISTENSEN, B.; HAN, M.; DILLON, J. K. The cause of cost in the management of odontogenic infections 1: a demographic survey and multivariate analysis. **J Oral Maxillofac Surg**, 71, n. 12, p. 2058-2067, Dec 2013.

DELBET-DUPAS, C.; DEVOIZE, L.; DEPEYRE, A.; MULLIEZ, A. *et al.* Are routine microbiological samplings in acute dental infections justified? Our 10-year real-life experience. **J Stomatol Oral Maxillofac Surg**, 120, n. 5, p. 397-401, Nov 2019.

FU, B.; MCGOWAN, K.; SUN, H.; BATSTONE, M. Increasing Use of Intensive Care Unit for Odontogenic Infection Over One Decade: Incidence and Predictors. **J Oral Maxillofac Surg**, 76, n. 11, p. 2340-2347, Nov 2018.

GAMS, K.; SHEWALE, J.; DEMIAN, N.; KHALIL, K. *et al.* Characteristics, length of stay, and hospital bills associated with severe odontogenic infections in Houston, TX. **J Am Dent Assoc**, 148, n. 4, p. 221-229, Apr 2017.

HEIM, N.; JURGENSEN, B.; KRAMER, F. J.; WIEDEMEYER, V. Mapping the microbiological diversity of odontogenic abscess: are we using the right drugs? **Clin Oral Investig**, 25, n. 1, p. 187-193, Jan 2021.

IGOUMENAKIS, D.; GKINIS, G.; KOSTAKIS, G.; MEZITIS, M. *et al.* Severe odontogenic infections: causes of spread and their management. **Surg Infect (Larchmt)**, 15, n. 1, p. 64-68, Feb 2014.

JOHNSON, R. E., 3rd; FOY, T. E.; ELLINGSEN, T. A.; NELSON, J. L. *et al.* Odontogenic Infections: Disease Burden During COVID-19 at a Single Institution. **J Oral Maxillofac Surg**, 79, n. 4, p. 830-835, Apr 2021.

KAKOSCHKE, T. K.; EHRENFELD, M.; MAST, G. [Severe bacterial soft tissue infections in the head and neck region : Overview of the causes, pathogenesis, diagnostics, treatment and possible sequelae]. **Chirurg**, 91, n. 4, p. 283-292, Apr 2020.

KANEKO, A.; MATSUMOTO, T.; IWABUCHI, H.; SATO, J. *et al.* Antimicrobial susceptibility surveillance of bacterial isolates recovered in Japan from odontogenic infections in 2013. **J Infect Chemother**, 26, n. 9, p. 882-889, Sep 2020.

KANG, S. H.; KIM, M. K. Antibiotic sensitivity and resistance of bacteria from odontogenic maxillofacial abscesses. **J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg**, 45, n. 6, p. 324-331, Dec 2019.

KESWANI, E. S.; VENKATESHWAR, G. Odontogenic Maxillofacial Space Infections: A 5-Year Retrospective Review in Navi Mumbai. **J Maxillofac Oral Surg**, 18, n. 3, p. 345-353, Sep 2019.

LAMENHA-LINS, R. M.; CAVALCANTI-CAMPELO, M. C.; CAVALCANTE-SILVA, C. R.; RODRIGUES-MOTA, K. *et al.* Odontogenic Infection and dental Pain negatively impact Schoolchildren's Quality of Life. **Acta Odontol Latinoam**, 33, n. 1, p. 38-44, Apr 1 2020.

LIAU, I.; HAN, J.; BAYETTO, K.; MAY, B. *et al.* Antibiotic resistance in severe odontogenic infections of the South Australian population: a 9-year retrospective audit. **Aust Dent J**, 63, n. 2, p. 187-192, Jun 2018.

LOPEZ-GONZALEZ, E.; VITALES-NOYOLA, M.; GONZALEZ-AMARO, A. M.; MENDEZ-GONZALEZ, V. *et al.* Aerobic and anaerobic microorganisms and antibiotic sensitivity of odontogenic maxillofacial infections. **Odontology**, 107, n. 3, p. 409-417, Jul 2019.

OGLE, O. E. Odontogenic Infections. **Dent Clin North Am**, 61, n. 2, p. 235-252, Apr 2017.

PLUM, A. W.; MORTELLITI, A. J.; WALSH, R. E. Microbial flora and antibiotic resistance in odontogenic abscesses in Upstate New York. **Ear Nose Throat J**, 97, n. 1-2, p. E27-E31, Jan-Feb 2018.

QU, L.; LIANG, X.; JIANG, B.; QIAN, W. *et al.* Risk Factors Affecting the Prognosis of Descending Necrotizing Mediastinitis From Odontogenic Infection. **J Oral Maxillofac Surg**, 76, n. 6, p. 1207-1215, Jun 2018.

RAJENDRA SANTOSH, A. B.; OGLE, O. E.; WILLIAMS, D.; WOODBINE, E. F. Epidemiology of Oral and Maxillofacial Infections. **Dent Clin North Am**, 61, n. 2, p. 217-233, Apr 2017.

RIEKERT, M.; KREPPEL, M.; ZOLLER, J. E.; ZIRK, M. *et al.* Severe odontogenic deep neck space infections: risk factors for difficult airways and ICU admissions. **Oral Maxillofac Surg**, 23, n. 3, p. 331-336, Sep 2019.

ROBERTSON, D.; SMITH, A. J. The microbiology of the acute dental abscess. **J Med Microbiol**, 58, n. Pt 2, p. 155-162, Feb 2009.

SEBASTIAN, A.; ANTONY, P. G.; JOSE, M.; BABU, A. *et al.* Institutional microbial analysis of odontogenic infections and their empirical antibiotic sensitivity. **J Oral Biol Craniofac Res**, 9, n. 2, p. 133-138, Apr-Jun 2019.

SHAKYA, N.; SHARMA, D.; NEWASKAR, V.; AGRAWAL, D. *et al.* Epidemiology, Microbiology and Antibiotic Sensitivity of Odontogenic Space Infections in Central India. **J Maxillofac Oral Surg**, 17, n. 3, p. 324-331, Sep 2018.

TORMES, A. K.; DE BORTOLI, M. M.; JUNIOR, R. M.; ANDRADE, E. S. Management of a Severe Cervicofacial Odontogenic Infection. **J Contemp Dent Pract**, 19, n. 3, p. 352-355, Mar 1 2018.

UPPADA, U. K.; SINHA, R. Outcome of Odontogenic Infections in Rural Setup: Our Experience in Management. **J Maxillofac Oral Surg**, 19, n. 1, p. 113-118, Mar 2020.

WEISE, H.; NAROS, A.; WEISE, C.; REINERT, S. *et al.* Severe odontogenic infections with septic progress - a constant and increasing challenge: a retrospective analysis. **BMC Oral Health**, 19, n. 1, p. 173, Aug 2 2019.

YUVARAJ, V. Maxillofacial Infections of Odontogenic Origin: Epidemiological, Microbiological and Therapeutic Factors in an Indian Population. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, 68, n. 4, p. 396-399, Dec 2016.

CAPÍTULO 3

Klebsiella pneumoniae: UMA VISÃO GERAL SOBRE ESSA ESPÉCIE BACTERIANA QUE DESPERTA PREOCUPAÇÃO CRESCENTE NA SAÚDE PÚBLICA MUNDIAL

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 12/12/2021

André Pitondo da Silva
Programas de Pós-graduação em Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto- UNAERP
Programas de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto- UNAERP
Ribeirão Preto, SP, Brasil
http://lattes.cnpq.br/3539676071345227

Rafael da Silva Goulart
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto
Ribeirão Preto, SP, Brasil
http://lattes.cnpq.br/9260128265599923

Carolina Bressan dos Reis
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto
Ribeirão Preto, SP, Brasil
http://lattes.cnpq.br/0608256114135657

Miguel Augusto de Moraes
Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Ribeirão Preto
Ribeirão Preto, SP, Brasil
http://lattes.cnpq.br/7628471267237369

Mariana de Oliveira-Silva
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto
Ribeirão Preto, SP, Brasil
http://lattes.cnpq.br/8479644236012424

Rafael Nakamura da Silva
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto
Ribeirão Preto, SP, Brasil
http://lattes.cnpq.br/4336488005201804

Amanda Kamyla Ferreira da Silva
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto
Ribeirão Preto, SP, Brasil
http://lattes.cnpq.br/2629562933213153

RESUMO: *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria que está entre os mais importantes patógenos causadores de infecções dentro e fora do ambiente hospitalar. Esta espécie acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos e idosos e está cada vez associada a casos de morbidade e mortalidade humana. Embora o nome da espécie seja sugestivo, as infecções causadas por *K. pneumoniae* não estão restritas às pneumonias, podendo ser diversas, incluindo infecções do trato urinário, septicemia, infecções de feridas cirúrgicas, endocardite, abscessos hepáticos e infecções oculares. Esta espécie bacteriana tem despertado particular preocupação mundial devido à crescente disseminação de cepas multirresistentes e hipervirulentas em diferentes ambientes. Devido às limitações terapêuticas cada vez maiores, a comunidade científica e profissionais da saúde têm investido com maior intensidade na prevenção da disseminação de *K. pneumoniae* com uma abordagem multidisciplinar, integrando saúde humana, saúde animal e meio ambiente. Este capítulo apresenta uma visão

geral sobre *K. pneumoniae*, abordando os aspectos gerais de identificação, patogenicidade, resistência aos antimicrobianos, epidemiologia e tratamento das infecções acometidas por essa espécie bacteriana.
PALAVRAS-CHAVE: *K. pneumoniae*. Identificação. Patogenicidade. Resistência antimicrobianos Epidemiologia. Tratamento.

Klebsiella pneumoniae: AN OVERVIEW OF THIS BACTERIAL SPECIES THAT IS OF GROWING CONCERN IN GLOBAL PUBLIC HEALTH

ABSTRACT: *Klebsiella pneumoniae* is a bacterium that is among the most important pathogens causing infections inside and outside the hospital environment. This species affects mainly immunocompromised individuals, newborns and seniors and is increasingly associated with cases of human morbidity and mortality. Although the species name is suggestive, infections caused by *K. pneumoniae* are not restricted to cases of pneumonia and can be diverse, including urinary tract infections, septicemia, surgical wound infections, endocarditis, liver abscesses, and ocular infections. This species has raised particular concern worldwide due to the increasing spread of multiresistant and hypervirulent strains in different environments. Due to increasing therapeutic limitations, the scientific community and health professionals have invested with greater intensity in preventing the spread of *K. pneumoniae* with a multidisciplinary approach, integrating human health, animal health and the environment. This chapter presents an overview of *K. pneumoniae*, covering the general aspects of identification, pathogenicity, antimicrobial resistance, epidemiology and treatment of infections affected by this bacterial species.
KEYWORDS: *K. pneumoniae*. Identification. Pathogenicity. Antimicrobial resistance. Epidemiology. Treatment.

1 | INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* que está entre os mais importantes patógenos causadores de infecções dentro e fora do ambiente hospitalar. A espécie foi descrita pela primeira vez em 1875 por Theodor Albrecht Edwin Klebs, enquanto examinava as vias aéreas de pacientes que morreram de pneumonia, e Carl Friedlander descreveu formalmente a espécie em 1882. Mais tarde, em 1885, Vittore Benedetto Antonio Trevisan de Saint-Léon nomeou o gênero como *Klebsiella* em homenagem ao bacteriologista alemão Theodor Klebs (ETYMOLOGIA, 2010; HUANG *et al.,* 2009; SRINIVASAN; RAJAMOHAN, 2020).

Desde sua descoberta, *K. pneumoniae* está cada vez mais associada a casos de morbidade e mortalidade humana, principalmente entre indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos e idosos. Os problemas clínicos causados por *K. pneumoniae* podem levar a graves complicações, incluindo infecções do trato urinário, septicemia, pneumonia, infecções de feridas cirúrgicas, endocardite, abscessos hepáticos e endoftalmite endógena (HUANG *et al.,* 2009; LONG *et al.,* 2017; EFFAH *et al.,* 2020). Estudos indicam que essa

espécie é responsável por cerca de um terço de todas as infecções causadas por bactérias Gram-negativas (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI*,* 2017; EFFAH *et al.,* 2020).

A grande capacidade dessa espécie bacteriana de sofrer recombinações cromossômicas e trocar plasmídeos, permite que elas alterem prontamente o seu repertório de fatores de virulência e de genes de resistência aos antimicrobianos, aumentando o seu potencial patogênico e dificultando o tratamento devido às limitações terapêuticas em cepas multirresistentes (LONG *et al.,* 2017). O surgimento de múltiplas resistências a antibióticos associadas aos fatores de virulência de *K. pneumoniae* é um problema global crescente e sua identificação precoce é primordial para o controle de infecções, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade (ELLEM *et al*., 2011).

Este capítulo apresenta uma visão geral sobre *K. pneumoniae*, abordando os aspectos gerais de identificação, patogenicidade, resistência aos antimicrobianos, epidemiologia e tratamento das infecções acometidas por essa espécie bacteriana.

2 I IDENTIFICAÇÃO

A identificação de bactérias patogênicas é um dos grandes desafios encontrados na clínica médica, porém de suma importância para a realização de intervenções terapêuticas especializadas para cada tipo de caso. No momento que o agente causador de uma infecção é identificado precocemente, os procedimentos a serem realizados como uso de medicamentos e cuidados necessários, aumentam a taxa de sucesso, proporcionando a melhora do paciente e evitando a possibilidade de prevalência de resistência bacteriana aos antimicrobianos. Para que isso ocorra, é necessária a identificação bacteriana com alta especificidade, incluindo gênero e espécie (VÁRADI *et al*., 2017).

2.1 Testes bioquímicos de identificação bacteriana

A identificação da *K. pneumoniae* pode partir de diversas amostras, então análise começa a partir da estrutura celular. Ao realizar a leitura da coloração de Gram no microscópio, são observados bastões rosas, afirmando ser um bacilo Gram-negativo. Diversos gêneros bacterianos apresentam essa característica e, por isso, é necessário, realizar mais testes que permitam distinguir o gênero e a espécie do isolado bacteriano.

O cultivo em meio seletivo para a *K. pneumoniae* é frequentemente realizado em ágar MacConkey que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e ainda distingue se o microrganismo é fermentador ou não de lactose. No caso, as cepas de *Klebsiella* sp., crescem com colônias na coloração rosa-avermelhada, indicando serem fermentadoras de lactose. Após o cultivo em MacConkey, são realizadas provas bioquímicas que irão identificar metabólitos produzidos pelos microrganismos e, ao analisar o conjunto dos resultados, é possível identificar o gênero e a espécie da bactéria. O ágar *Triple Sugar Iron*

(TSI) avalia a fermentação de glicose, lactose e sacarose, além de demonstrar a produção de gás H_2S e de CO_2, já o Lisina Descarboxilase (LIA), monitora a produção da enzima lisina. O Ágar Citrato indica se a bactéria utiliza o citrato como substrato. O Ágar Ureia indica a produção de urease e o Ágar *Sulfide Indole Motility* (SIM), a produção de H_2S, de indol (por meio da hidrolise do triptofano pela triptofanase) e também permite observar a motilidade do microrganismo (BARTH *et al.,* 2010; SALVATIERRA, 2016).

Para a *K. pneumoniae*, o teste de TSI apresenta cor amarelada na base indicando fermentação, e o desprendimento do meio de cultura da base do tubo, indicando presença de CO_2. No tubo de LIA, a base fica amarelada indicando lisina negativo, já no Citrato o tubo fica azul, demonstrando o uso do citrato como fonte de carbono. O tubo de ureia fica rosa com presença de urease e, por fim, o SIM permanece inalterado, indicando que não ocorre a produção de H_2S, indol, nem motilidade da bactéria. Portanto, com relação às provas bioquímicas, de forma resumida, pode-se dizer que *K. pneumoniae* é uma espécie não móvel, fermentadora de glicose, não produz H_2S, indol, nem lisina, mas produz urease e utiliza o citrato como substrato (BARTH; FREITAS; MARTINS; PEREZ, 2010; SALVATIERRA, 2016).

2.2 Métodos automatizados de identificação

Métodos automatizados como o Vitek-2 (bioMérieux, Hazelwood, EUA) são utilizados para identificar bactérias por meio de cartões que possuem diversos testes bioquímicos que determinam os diferentes tipos de enzimas presentes nas espécies bacterianas e, com isso, identificam o gênero e espécie da mesma de acordo com os dados obtidos e a análise do banco de dados existente. O Vitek-2 facilita a realização dos testes bioquímicos e acelera a identificação do microrganismo quando comparado aos testes realizados manualmente (SANDLE., 2016; GRAF *et al*., 2000). O sistema Vitek-2 tem sido utilizado há muito tempo com bastante eficiência para identificar *K. pneumoniae.* No entanto, alguns estudos têm indicado que o sistema não é eficaz na identificação de *K. variicola*, que é erroneamente identificada como *K. pneumoniae* (CAMPOS *et al.,* 2021).

Uma vantagem do método automatizado Vitek-2 é que o equipamento permite determinar, pelo método de microdiluição, a susceptibilidade antimicrobiana das bactérias avaliadas ao mesmo tempo em que são identificadas, utilizando cartões específicos contendo diferentes antibióticos (GRAF *et al*., 2000; KARAGÖZ; ACAR; KÖRKOCA, 2015).

Um outro método automatizado que vem ganhando espaço nos laboratórios de microbiologia é o MALDI-TOF-MS (do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*), que é um método que revolucionou a identificação bacteriana pela praticidade e rapidez. Esse método permite identificar a espécie bacteriana em minutos, possibilitando uma grande quantidade de identificações em um curto período de tempo. O método é baseado na caracterização de proteínas ribossomais mais abundantes no microrganismo. A amostra é incorporara em uma solução matriz e

exposta a pulsos de laser, gerando moléculas ionizadas de diferentes tamanhos. Assim a análise é realizada por meio do tempo que as moléculas demoram para chegar ao detector, avaliando a relação da massa e da carga das mesmas, formando diferentes espectros de massas que são específicos para cada espécie bacteriana. Os espectros obtidos são submetidos a um banco de dados que contém milhares de espectros que, por similaridade, permitem a identificação das espécies bacterianas avaliadas (DINGLE; BUTTLER-WU, 2013; SANDLE, 2016).

O MALDI-TOF-MS apresenta vantagens quando comparado aos métodos anteriores, pelo fato de apresentar reprodutividade, pela padronização na extração e análise, ser de fácil realização, apresentar alta velocidade de realização e ter alto rendimento e baixo custo. Porém, existem limitações como a capacidade de diferenciar bactérias taxonomicamente relacionadas e necessitar de alto investimento de aquisição e manutenção dos instrumentos para realização dos testes (CROXATTO; PROD'HOM; GREB, 2012; SANDLE, 2016).

2.3 Identificação genotípica

A identificação genotípica se dá pela avaliação do sequenciamento de genes específicos ou até mesmo do genoma completo da bactéria, sem a necessidade de testes bioquímicos prévios e, em determinadas ocasiões, sem a necessidade do cultivo das bactérias.

Dentre os genes, existem dois principais que constituem a porção operante do RNA ribossomal 16s (ou 16S rRNA) e o 23S rRNA, que estão presentes em todas as bactérias e são muito conservados entre as diferentes espécies, tornando-se, portanto, espécie-específicos. O sequenciamento parcial de regiões conservadas desses genes permite a diferenciação das principais espécies bacterianas, possibilitando a classificação em nível de espécie e, muitas vezes, subespécie (CLARRIDGE, 2004; SANDLE, 2016).

2.4 Perspectivas futuras na identificação de *K. pneumoniae*

Atualmente, com a redução dos custos do sequenciamento e a rapidez com a qual as análises são realizadas, é possível sequenciar genomas bacterianos inteiros em um intervalo de tempo reduzido (SEGERMAN, 2020). Isso possibilita, além da identificação precisa da espécie bacteriana, a revelação de todo o seu conteúdo genético, o qual pode ser utilizado em diversas aplicações, desde a identificação de genes de resistência (resistoma) a antimicrobianos, genes de virulência (viruloma), tipagem molecular e até estudos epidemiológicos e de genômica comparativa (FRANKLIN *et al.*, 2021).

Especialmente para *K. pneumoniae*, devido à sua crescente disseminação e associação com diversas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) com cepas multirresistentes e hipervirulentas, os sequenciamentos de genomas completos têm sido cada vez mais úteis tanto na identificação da espécie, quanto como uma ferramenta viável de vigilância de resistência antimicrobiana e potencial patogênico (BOOLCHANDANI;

D'SOUZA; DANTAS, 2019; CAMPOS *et al.,* 2021). Desta forma, é esperado que, num futuro próximo, o sequenciamento de genomas de *K. pneumoniae* seja cada vez mais comum, auxiliando na sua rápida identificação e também para auxiliar nos aspectos terapêuticos e epidemiológicos da espécie.

3 I PATOGENICIDADE

O termo patogenicidade se refere à capacidade que os microrganismos apresentam em causar alterações fisiológicas, ou seja, em causar doenças no hospedeiro (VIEIRA, 2009). Algumas barreiras de defesa do corpo precisam ser ultrapassadas pelas bactérias para que elas possam se alimentar e se reproduzir, colonizando o ambiente, sendo essas barreiras mecânicas, químicas e celulares. Uma das primeiras barreiras encontradas, é a depuração mucociliar que impulsiona mecanicamente os microrganismos, pela motilidade dos cílios, assim como o fluxo urinário e o peristaltismo intestinal, levando os microrganismos para fora do corpo. Já nas barreiras químicas, pode-se citar a cascata de enzimas que são liberadas pelo sistema complemento a fim de promover a opsonização dos microrganismos, facilitando a ação da última barreira natural do corpo, as nossas células de defesa que reconhecem, fagocitam e destroem os patógenos (BENGOECHEA; PESSOA, 2018).

Os microrganismos capazes de romper as barreiras do corpo possuem e expressam genes que codificam fatores de virulência, se diferenciando dos demais microrganismos da espécie, sendo chamados então de microrganismos virulentos. Portanto, quanto mais fatores de virulência uma bactéria possui, maior o seu potencial patogênico (VIEIRA, 2009). *K. pneumoniae* é uma espécie bacteriana considerada como patógeno oportunista, acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos. No entanto, o relato de cepas virulentas tem sido cada vez maior e, nos últimos tempos, vem sendo encontradas cepas hipervirulentas que apresentam maior resistência contra a atividade bactericida do soro e à atividade mediadas por neutrófilos e macrófagos. As cepas hipervirulentas causam infecções mais invasivas com grande chance de disseminação, inclusive em pacientes saudáveis. Dentre as cepas hipervirulentas, há alguns antígenos capsulares que são mais comuns, incluindo os sorotipos K1 e K2. Muitas destas cepas apresentam um fenótipo denominado hipermucoviscosidade que é resultante de uma capsula de maior tamanho devido ao aumento da produção de polissacarídeo capsular, mediado principalmente pela presença de genes específicos como *rmp*A e *mag*A, tornando as colônias destas cepas mais viscosas (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017; CAMPOS *et al*., 2018).

Muitas linhagens de *K. pneumoniae* apresentam genes de virulência ligados a formação de fimbrias, de cápsula, de lipopolissacarídeos (LPS) e também para captação de ferro. A formação de adesinas é importante para a fixação do microrganismo em tecidos epiteliais, mucosas e demais superfícies. Já as cápsulas proporcionam para as bactérias

uma proteção extra contra substâncias nocivas, dificultam o reconhecimento do sistema imune e conferem maior potencial para formar biofilmes (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017). O LPS é um dos fatores de virulência que mais estão associados à resposta imunológica, por isso as bactérias podem variar a estrutura desse polissacarídeo para que não sejam facilmente detectadas pelo sistema imune do hospedeiro. Os sideróforos, como são conhecidas as moléculas da captação de ferro, são de vital importância para o crescimento e colonização, visto que o ferro é um componente indispensável do metabolismo microbiano (WANG *et al.*, 2020).

Os biofilmes são formados por matriz polimérica aderida em superfícies, cercadas de colônias, ou seja, é constituído basicamente por um aglomerado de células microbianas e pelos produtos que elas secretam (LANGER *et al.*, 2018). As principais substâncias poliméricas secretadas apresentam estruturas complexas contendo polissacarídeos, DNA e proteínas. Em um biofilme de *K. pneumoniae,* a formação da sua estrutura extracelular apresenta fímbrias do tipo 3 e polissacarídeos capsulares, sendo que a fímbria confere aderência e estabilidade, enquanto os polissacarídeos atribuem formato à sua estrutura e permitem a comunicação celular dentro do biofilme. Os relatos mais comuns de formação de biofilmes de *Klebsiella* estão relacionados com as superfícies de dispositivos internos, como os cateteres e mucosas dos tratos respiratório, urinário e gastrointestinal (WANG *et al.,* 2020).

A infecção por *K. pneumoniae* pode acontecer em locais distintos do corpo, de acordo com os fatores de virulência e também de onde e como ocorreu o contato com a cepa. A pneumonia por esses patógenos pode evoluir para sintomas mais graves, como choque séptico e insuficiência respiratória, acarretando na morte do paciente. Como a maioria das enterobactérias, a infecção mais recorrente por *K. pneumoniae* é do trato gastrointestinal e do trato urinário. A sintomatologia desses locais consiste em diarreia/desinteria, podendo gerar enterocolite e, no trato urinário, poliúria/polaciúria e disúria. Uma característica em comum desses focos de infecção é o agravamento do quadro clínico do paciente para uma bacteremia, complicação frequente em infecções causadas por *K. pneumoniae* hipervirulentas. As meningites não fogem das infecções causadas por esse microrganismo, alarmantemente *K. pneumoniae* tornou-se uma das causas comuns de meningites adquiridas na comunidade, podendo originar-se de uma infecção primária inicial ou secundária, à disseminação metastática (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013).

4 I RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência aos antimicrobianos obteve um aumento preocupante nas últimas décadas, uma vez que a disseminação de cepas multirresistentes tem sido cada vez maior, e isso se deve ao rápido desenvolvimento de mecanismos de resistência das bactérias, principalmente pelo uso rotineiro e, muitas vezes, indiscriminado desses antimicrobianos

na medicina humana e agropecuária (NATHAN, 2020). Entre as espécies bacterianas mais frequentes e preocupantes nas infecções hospitalares, estão *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. que compreendem o grupo ESKAPE, denominado pelas iniciais dessas espécies e frequentemente são multirresistentes. As cepas do grupo ESKAPE são consideradas altamente críticas e possuem grande capacidade de disseminação (MOROSINI; CANTÓN, 2018; WOLFF *et al.,* 2021). *K. pneumoniae* apresenta facilidade de adquirir plasmídeos e transposons de resistência via transferência horizontal, tornando-se uma das maiores fontes de resistência a antimicrobianos (PIPERAKI *et. al.,* 2017).

A alta prevalência de KP-MDR (do inglês *K. pneumonie multidrug-resistant*) e um aparecimento elevado de KP-XDR (do inglês *K. pneumonie extensively drug-resistant*), tem sido um cenário comum em diversas partes do mundo. *K. pneumoniae* ao longo dos anos vem apresentando prevalência de resistência as quatro principais classes de antimicrobianos, as cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos. Até 2005, era comum encontrar *K. pneumonie* sensíveis aos carbapenêmicos, no entanto, em 2015, KP-MDR surgiram em diversos países como Grécia, Itália e Romênia com índices superiores a 40% de resistência aos carbapenêmicos (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

A resistência aos antimicrobianos se dá por diversos mecanismos, incluindo redução ou alteração na permeabilidade da membrana externa, sistemas de bombas de efluxo, alteração do sítio alvo, proteção ou bloqueio do sítio alvo e, produção de enzimas capazes de clivar o anel β-lactâmico presente em antimicrobianos β-lactâmicos (penincilinas, cefalosporinas, oxacilinas e carbapenêmicos), lhes conferindo a resistência. As β-lactamases podem ser divididas em *metalo-β-lactamases* e em *serinas-β-lactamases*, de acordo com a necessidade ou não de cátions metálicos como cofator de ativação enzimática (LEE *et al.,* 2016).

Durante os anos noventa, foram identificadas as primeiras *extended-spectrum β-lactamases* (ESBL), *sulfhydryl reagent variable* (SHV-1) e Temoniera (TEM-1), conferindo resistência aos β-lactâmicos como cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos (NAVON-VENEZIA *et al*., 2017). A década de 90 foi marcada pelo surgimento de diversas ESBLs, como bla_{CTXM}-type, bla_{PER}, bla_{GES} e diversos outras que se disseminaram pelo mundo e se tornaram endêmicos em algumas regiões, demostrando a generalização da resistência, com mais de 50% de resistência às cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos (WHO, 2014).

Com o surgimento de diversas *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, a clínica passou a utilizar cada vez mais os carbapenêmicos, que são uma das últimas estratégia de tratamento, ocasionando o rápido surgimento das primeiras cepas resistentes aos carbapenêmicos, e tornando mais frequente KP-XDR.

A primeira carbapenemase-KPC foi identificada nos Estados Unidos, e se disseminou

pelo mundo, quase uma década depois, KPC-2 e KPC-3, estavam já geograficamente distribuídas em todos os continentes. A *New Delhi metalo-β-lactamase*-1 (NDM-1) é mais comum na Índia, enquanto a oxacilinase, OXA-48, é endêmica do Mediterrâneo e Europa e estão presentes tanto em comunidade quanto em ambiente hospitalar, enquanto a KPC é usualmente encontrada em ambiente hospitalar. Juntas, KPC, NDM e OXA-48 são as principais β-lactamases responsáveis pela diversidade de *K. pneumoniae* multirresistentes (BRISE, 2009; VOULGARI *et al.,* 2013).

KP-MDR estão amplamente distribuídas e são consideradas endêmicas de algumas regiões. Nos Estados Unidos, China, Israel, Brasil e Colômbia são encontradas KP-MDR resistentes as cefamicinas, cefalosporinas, penicilinas e aos carbapenêmicos. Outras áreas como Turquia, Norte da África e oeste Europeu apresentam KP-MDR com resistência às penicilinas, *β*-lactâmicos associados com inibidores de de *β*-lactamases e carbapênemicos (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

Essa ampla distribuição de KP-MDR mostra a frequência e o aumentos da resistência a antimicrobianos pelo mundo, alertando sobre a disseminação de *K. pneumonie* multirresistentes. Além disso, devido ao elevado uso de antimicrobianos durante a atual Pandemia de COVID-19 para tratamento de co-infecções e profilaxia, Hirabayashi *et al.* *(*2021), apontaram um aumento de 14,5% de KP-MDR entre 2019-2020. Esse aumento considerável de KP-MDR está também ligado às transmissões nosocomiais, principalmente, devido ao contato com as mãos, uma vez que KP-MDR estão disseminadas pelo ambiente hospitalar e, também na microbiota dos pacientes e, ao movimentar o paciente para procedimentos, facilita a infecção (TIRI *et al.,* 2020).

5 I EPIDEMIOLOGIA

5.1 Ambiente hospitalar

K. pneumoniae é um importante patógeno oportunista, especialmente, em ambiente nosocomial, atingindo pacientes imunocomprometidos. Vários estudos em diferentes regiões do Brasil já relataram isolados de *K. pneumoniae* possuindo diversas características fenotípicas e moleculares preocupantes, do ponto de vista epidemiológico. Na região norte, Ferreira *et al.* 2019 investigaram 25 *K. pneumoniae* isoladas de pacientes de unidades de terapia intensiva (UTI), 21 (84%) dos isolados foram classificados como MDR (do inglês *multidrug-resistant*) e diversos genes importantes foram detectados em grande parte dos isolados: bla_{KPC} (100%), bla_{OXA-1} (84%), *mrk*D (96%), *fim*H-1 (88%), *ent*B (100%), *AcrAB* (100%), *tol*C (24, 9%), *mdt*K (22, 8%). Na região nordeste, Nakamura-Silva *et al.* 2021 caracterizaram 13 *K. pneumoniae* multirresistentes e virulentos isoladas de diferentes fontes em pacientes hospitalizados as quais pertenciam a um grupo clonal (CG, do inglês *clonal group*) considerado de alto risco internacional, o CG258. Na região sul, Gonçalves *et al.*

(2017) estudaram 26 isolados nosocomiais de *K. pneumoniae,* sendo que 14 (53,8%) foram classificados como MDR, sete (26,9%) XDR (do inglês *extensively drug-resistant*) e três (11,5%) PDR (do inglês *pandrug-resistant*). Os estudos supracitados avaliaram amostras coletadas de pacientes internados em hospitais terciários em diferentes regiões do Brasil, evidenciando o preocupante cenário encontrado no país em relação à *K. pneumoniae* no ambiente hospitalar.

5.2 Fora do ambiente hospitalar

K. pneumoniae nosocomiais geram grandes preocupações à saúde pública, entretanto, essas preocupações não devem estar somente direcionadas ao ambiente interno hospitalar. Fora do ambiente hospitalar, *K. pneumoniae* pode causar infecções adquiridas na comunidade que não são consideradas oportunistas. Essas infecções incluem endoftalmites, pneumonias, fasceítes necrotizantes, abscessos não hepáticos e meningites. Cepas hipervirulentas têm demonstrado a capacidade de causar infecções em locais incomuns ou múltiplos em indivíduos saudáveis, podendo disseminar para diferentes locais e causarem bacteremia. Os fatores de risco do hospedeiro para infecções adquiridas na comunidade por *K. pneumoniae* incluem alcoolismo, diabetes entre outros (Wyres *et al.,* 2020*).*

Azevedo *et al. (*2019) avaliaram 48 *K. pneumoniae* isoladas de infecções no trato urinário em pacientes da comunidade, na região sudeste do Brasil, demonstrando a presença de 29 (60,4%) isolados multirresistentes, 18 (37,5%) contendo o gene bla_{KPC} e 7 (14,6%) pertencentes ao CG258. Por tratarem-se de pacientes da comunidade, esses resultados levantaram um alerta sobre a vigilância epidemiológica relacionada à possível colonização de pacientes com alta hospitalar, com o intuito profilático de deter a disseminação de infecções causadas por bactérias resistentes na comunidade. Adicionalmente, Nakamura-Silva *et al. (*2021) reportaram uma cepa de *K. variicola* expressando o fenótipo de hipermucoviscosidade, isolada de infecção endodôntica primária, demonstrando assim, a presença de *Klebsiella* (incluindo outras espécies) portadoras de características preocupantes em áreas da saúde fora do ambiente hospitalar.

5.3 *K. pneumoniae* no meio ambiente e em animais

A grande ameaça global da resistência bacteriana vem sendo analisada pela abordagem de Saúde Única (*One Health*), pois o crescimento da resistência aos antimicrobianos ocorre nos múltiplos setores interconectados: humano-animal-ambiente (COLLIGNON; MCEWEN, 2019). Portanto, além dos relatos clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de infecções em humanos, é cada vez mais comum o relato de isolados ambientais multirresistentes desta espécie, incluindo esgoto hospitalar (ZAGUI *et al.*, 2020). Da mesma forma, há diversos relatos de infecções por *K. pneumoniae* em animais, como descrito no estudo de Vaneci-Silva *et al.* (2022) que detectaram mortalidade

em massa em cultivo de tilápias do Nilo, causada por esta espécie. Novos estudos objetivando compreender as rotas de transmissão vêm sendo realizados, como é o caso de Leangapichart *et al*. (2021) que caracterizaram molecularmente 253 *K. pneumoniae* isoladas de porcos e humanos em fazendas na Tailândia, os resultados sugeriram a possibilidade de transmissão zoonótica em um pequeno subconjunto de clones, no entanto, haviam limitações metodológicas apontadas pelos próprios autores.

5.4 Epidemiologia molecular

Os estudos moleculares têm sido muito úteis no estudo de populações bacterianas e vêm demonstrando que *K. pneumoniae* possui uma população molecularmente diversa, entretanto, bem estruturada. Esse fato permite o aprimoramento da compreensão epidemiológica e das variações genéticas de linhagens patogênicas e resistentes aos antimicrobianos. Para caracterizar linhagens de *K. pneumoniae* baseando-se em suas variações genéticas, a técnica de MLST (do inglês *multilocus sequence typing*) tem sido muito útil. Nessa técnica molecular, são avaliadas variações em nucleotídeos de sete genes denominados *housekeeping* (*rpo*B, *gap*A, *mdh*, *pgi*, *pho*E, *inf*B e *ton*B), que geram um número de ST (*sequence type*) (DIANCOURT *et al.*, 2005; CHEN *et al*. 2014). A geração desses dados permite sua implementação em bancos de dados internacionais, o que é essencial para analisar e entender o panorama global da epidemiologia de *K. pneumoniae*.

Alguns STs são bastante conhecidos por serem clones frequentemente resistentes aos antimicronianos, incluindo ST11 e ST258. Outros são conhecidos por serem clones hipervirulentos, como o ST23 e ST86. Sobretudo, deve-se considerar a qual CG o ST pertence (YU *et al*., 2018). Como mencionado anteriormente, o CG258 é um grupo clonal considerado de alto risco global, os grupos clonais de *K. pneumoniae* considerados globalmente problemáticos, podem ser divididos em duas categorias: multirresistentes, composto por oito CGs (CG15, CG20, CG29, CG37, CG147, CG101, CG258 e CG307) e os virulentos, composto por seis CGs (CG23, CG25, CG65, CG66, CG86 e CG380) (WYRES; LAM; HOLT, 2020).

6 | TRATAMENTO

A principal dificuldade no tratamento das diferentes infecções causadas por *K. pneumoniae* é a resistência aos antimicrobianos. Os recursos terapêuticos não têm acompanhado a evolução dos mecanismos de resistências adquiridos por *K. pneumoniae,* limitando cada vez mais as opções de tratamento para essa espécie (VERDI *et al.,* 2016).

Os antimicrobianos mais utilizados na terapêutica para infecções por *K. pneumoniae* são penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosideos e quinolonas. Segundo Muniz *et al.* (2019), *K. pneumoniae* tem desenvolvido mecanismos de resistência a vários antimicrobianos, como alterações na permeabilidade da membrana externa, criação de sistemas de bomba

de efluxo, produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), produção de beta-lactamases cromossômicas (AmpC), produção de carbapenemases tipo metalo-betalamase e *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC). Esses mecanismos de resistência atuam diretamente no efeito farmacológico dos antimicrobianos, diminuindo a captação da droga ou inativando a sua ação. É importante ressaltar que cepas de *K. pneumoniae* são intrinsicamente resistentes à ampicilina devido à presença da penicilinase SHV-1 no seu cromossomo (WYRES; HOLT, 2016)

O tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de KPC é um desafio para a equipe de saúde por serem resistentes a múltiplas drogas, acarretando no alto custo de tratamento e também altas taxas de mortalidade. Tem sido cada vez mais comum o isolamento de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a uma grande quantidade de antimicrobianos, como os carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (SANTOS; SECOLI, 2019).

Para o tratamento de bactérias multirresistentes é interessante buscar alternativas terapêuticas que tragam efetividade e potencialização dos antimicrobianos existentes, como a associação de vários antimicrobianos de classes distintas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza como terapia empírica para infecções causadas por *K. pneumoniae* multirresistentes, o uso da polimixina B e/ou colistina em associação com mais um ou dois antimicrobianos como gentamicina, amicacina, tigeciclina e alguns carbapenêmicos como o meropenem ou doripenem. A escolha dos antimicrobianos a serem associados à polimixina B e/ou colistina, deve ser baseada no perfil de susceptibilidade da cepa isolada, no histórico epidemiológico do hospital ou da região e também no tipo de infecção causada pela bactéria e, por fim, na ação farmacológica esperada para o antimicrobiano (ANVISA, 2013).

Os aminoglicosídeos têm como mecanismo de ação a inibição de forma irreversível a síntese proteica pela sua ligação na subunidade 30s do ribossomo bacteriano e, para sua efetividade, é necessário que penetrem no interior da célula bacteriana. Isso acontece por intermédio de sua interação com a superfície celular, que possibilita o transporte passivo da molécula e acoplamento ao ribossomo (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006). Fazem parte desta classe gentamicina, tobramicina e amicacina (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Os carbapenêmicos agem sobre as células bacterianas adentrando através de proteínas denominadas porinas e agem nas proteínas ligantes de penicilina que atuam no processo de síntese da parede celular bacteriana, inibindo a síntese de peptideoglicanos (COSTA, 2019). Os carbapenêmicos possuem um amplo espectro de ação e geralmente são reservados para infecções hospitalares mais graves e para uso em cepas multirresistentes, por serem mais seguros quando comparados aos efeitos adversos causados pelas polimixinas, que são utilizadas como último recurso para estes casos (SANTANA, 2019).

As tetraciclinas são antibióticos de amplo espectro contra bactérias e também mostram efetividade sobre alguns protozoários. Fazem parte desta classe, a tetraciclina,

doxiciclina, tigeciclina e minociclina (BAZEI, 2019). Têm ação bacteriostática, agem através da penetração na célula bacteriana por transporte ativo ou passivo e se ligam de forma reversível à subunidade 30s do ribossomo bacteriano, impedindo que o RNA de transferência (tRNA) se associe ao ribossomo e promova a síntese proteica (D'EL REY-DANTAS *et al.*, 2018).

A prevenção da resistência aos antimicrobianos é a principal arma no combate às cepas *K. pneumoniae* produtoras de KPC, já que o tratamento é limitado devido à sua alta resistência a diferentes antimicrobianos, aumentando as chances de insucesso e consequente óbito dos pacientes acometidos.

7 | CONCLUSÃO

As doenças infecciosas sempre foram um grande desafio para a humanidade. Com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming na primeira metade do século XX, houve uma revolução histórica no tratamento das infecções bacterianas. A partir daí, novos antimicrobianos começaram a ser descobertos, com maior intensidade em meados da década de 1950. No entanto, ao mesmo tempo em que bactérias resistentes começaram a se disseminar, houve um declínio gradual no desenvolvimento de novos antimicrobianos. Atualmente, a humanidade vive uma crescente crise na terapia de doenças infecciosas causadas por bactérias devido à resistência aos antimicrobianos, sendo *K. pneumoniae* uma das espécies mais preocupantes (LOBANOVSKA; PILLA, 2017; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

K. pneumoniae, tem despertado particular preocupação devido à crescente disseminação de cepas multirresistentes e hipervirulentas causando diferentes tipos de infecções em hospitais e na comunidade, com altas taxas de morbidade e mortalidade. Devido às limitações terapêuticas cada vez maiores, é imprescindível investir em estudos epidemiológicos, políticas públicas de saúde envolvendo uso racional e pesquisa de novos antimicrobianos, terapias alternativas e, sobretudo, a prevenção da disseminação de *K. pneumoniae* com uma abordagem multidisciplinar integrando saúde humana, saúde animal e meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Nota Técnica nº 01/2013: Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes. Brasília, abr. 2013.

AZEVEDO, P. A. A.; FURLAN, J. P. R.; GONÇALVES, G. B.; GOMES, C. N.; GOULART, R. DA S.; STEHLING, E. G.; PITONDO-SILVA, A. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to CC258 isolated from outpatients with urinary tract infection in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. 2019 v. 18, p. 74-79. doi: 10.1016/j.jgar.2019.01.025.

BARTH, A. L.; FREITAS, A L. P.; MARTINS, A. F.; PEREZ, V. P. **Identificação de bacilos Gram-Negativos: enterobactérias. Bacteriologia Clínica: manual de aulas práticas.** Porto Alegre: Editora Sulina, 2010. Cap. 7. p. 59-69.

BENGOECHEA, J.; PESSOA, J. S. *Klebsiella pneumoniae*infection biology: living to counteract host defences. Fems Microbiology Reviews. 2018, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 123-144, 18 nov. Oxford University Press (OUP).

BOOLCHANDANI, M.; D'SOUZA, A. W.; DANTAS, G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. **Nature Reviews Genetics**. 2019 v. 20, n. 6, p. 356-370.

BRISSE, S.; FEVRE, C.; PASSET, V.; ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; TOURNEBIZE, R.; DIANCOURT, L.; GRIMONT, P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PLoS One**. 2009; v. 4, p.e4982.

CAMPOS T. A.; DE ALMEIDA, F. M.; DE ALMEIDA, A. P. C.; NAKAMURA-SILVA, R.; OLIVEIRA-SILVA, M.; DE SOUSA, I. F. A.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N.; PAPPAS, G. J. JR.; PITONDO-SILVA, A. Multidrug-Resistant (MDR) *Klebsiella variicola* Strains Isolated in a Brazilian Hospital Belong to New Clones. **Frontiers in Microbiology**. 2021 v. 16, n.; 12, p. 604031.

CAMPOS, T. A.; GONÇALVES, L. F.; MAGALHÃES, K. G.; DE PAULO MARTINS, V.; PAPPAS JÚNIOR, G. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D.; GONÇALVES, G. B.; FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G.; PITONDO-SILVA, A. A Fatal Bacteremia Caused by Hypermucousviscous KPC-2 Producing Extensively Drug-Resistant K64-ST11 *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Frontiers in Medicine**. 2018. v. 21, n. 5, p. 265.

CATALÁN-NÁJERA, J. C.; GARZA-RAMOS, U.; BARRIOS-CAMACHO, H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? **Virulence.** 2017**.** v. 8, n. 7, p. 1111-1123.

CHEN, L.; MATHEMA, B.; CHAVDA, K. D.; DELEO, F. R.; BONOMO, R. A.; KREISWIRTH, B. N. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends Microbiology**. 2014, v. 22, n. 12, p. 686-696.

CHUNG, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, 2016, v. 63, p.20: fnw219.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**. 2004; ed. 3, 17(4):840-62, table of contents.

COLLIGNON, P. J.; MCEWEN, S. A. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v.4, n. 1, p. 22, 2019.

COSTA, B. S. **Superbactérias e o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos.** 2019. 57 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2019.

CROXATTO. A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews.** 2012, v. 36, n. 2, p. 380-407.

D'EL REY-DANTAS, F, T.; FEIJÓ, L, S.; NOGUEIRA, C. E. W.; CURCIO, B. R. Doxiciclina: uma revisão sobre particularidades e utilização clínica na espécie equina. **Science and Animal Health**. 2018, v. 6, n. 2, p. 101-113.

DIANCOURT, L.; PASSET, V.; VERHOEF, J.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. 2005, v. 43, n. 8, p. 4178-82. doi: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005.

DINGLE, T. C.; BUTLER-WU, S. M. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. **Clinics in Laboratory Medicine.** 2013. V. 33, n. 3, p. 589-609.

EFFAH, C. Y.; SUN, T.; LIU, S.; WU, Y. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. 2020. V. 9, n. 19, p. 1.

ELLEM, J., PARTRIDGE, S. R., IREDELL, J. R. Efficient direct extended-spectrum beta-lactamase detection by multiplex real-time PCR: Accurate assignment of phenotype by use of a limited set of genetic markers. **Journal of Clinical Microbiology.** 2011, v. 49, p. 3074–3077.

Etymologia: *Klebsiella*. Emerging Infectious Diseases. 2010. V. 16, n. 9, p. :1418. https://doi.org/10.3201/eid1609.et1609. Acessado em: 12 dez. 2021.

FERREIRA, R. L.; DA SILVA, B. C. M.; REZENDE, G. S.; NAKAMURA-SILVA, R.; PITONDO-SILVA, A.; CAMPANINI, E. B.; BRITO, M. C. A.; DA SILVA, E. M. L.; FREIRE, C. C. M.; CUNHA, A. F.; PRANCHEVICIUS, M. C. DA S. High Prevalence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Harboring Several Virulence and β-Lactamase Encoding Genes in a Brazilian Intensive Care Unit. **Frontiers in Microbiology**. 2018, v. 22, n. 9, p. 3198, 2019.

Franklin AM, Brinkman NE, Jahne MA, Keely SP. Twenty-first century molecular methods for analyzing antimicrobial resistance in surface waters to support One Health assessments. **Journal of Microbiological Methods**. 2021, v. 184, p. 106174.

GONÇALVES, G. B. et al. Spread of multidrug-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones in a tertiary hospital from southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 56, p.1-7, 2017.

GRAF, B., ADAM, T., ZILL, E., GÖBEL, U. B. Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Yeasts and Yeast-Like Organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, 2000; v. 38, n. 5, p. 1782–1785.

HIRABAYASHI, A., KAJIHARA, T., YAHARA, K., SHIBAYAMA, K., SUGAI, M. Impact of the COVID-19 pandemic on the surveillance of antimicrobial resistance. **Journal of Hospital Infection**. 2021. V. 117, p. 147-156.

Huang YJ, Liao HW, Wu CC, Peng HL. 2009. MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **Research in Microbiology**. V. 160, n. 1, p. 71-79.

Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology.** 2019, v. 51, p. 72-80

KARAGÖZ A, ACAR S, KÖRKOCA H. Characterization of *Klebsiella* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and determination of antimicrobial resistance with VITEK 2 advanced expert system (AES). **Turk J Med Sci**. 2015, v. 45, n. 6, p. 1335-44.

LANGER, Luciana Teresinha Adams; STAUDT, Keli Jaqueline; CARMO, Raiza Lima do; ALVES, Izabel Almeida. Biofilmes em infecção por Candida: uma revisão da literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, Santo Ângelo. 2018, v. 2, n. 2, p. 1-15.

LEANGAPICHART, T. et al. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* complex isolates from pigs and humans in farms in Thailand: population genomic structure, antibiotic resistance and virulence genes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2016. v. 76, n. 8, p. 2012-2016

LEE, C.R.; LEE, J.H.; PARK, K.S.; KIM, Y.B.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in microbiology**, 2016, v. 7, p. 895.

Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? Yale Journal of Biology and Medicine. 2017, v. 90, n. 1, p. 135-145.

Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, Olsen RJ. Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella* variicola, and *Klebsiella quasipneumoniae*. **mSphere.** 2017, v. 2, n. 4, p. :e00290-17.

MOROSINI, M.I.; CANTÓN,R. Changes in bacterial hospital epidemiology. **Revista Española de Quimioterapia.** 2018, v. 31, n. 1, p. 23-26.

MUNIZ, J. J., et al. Antimicrobial resistance to *Klebsiella pneumoniae* in a Hospital of Minas Gerais. **Revista de Ciências da Saúde Básica e Aplicada**. 2019. v. 2, p. 3-10, jul.

NAKAMURA-SILVA, R. et al. Characterization of multidrug-resistant and virulent *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk clonal group 258 (CG258) isolated from inpatients in northeastern Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 4351-4359, 2021.

NAKAMURA-SILVA, R. et al. First report of hypermucoviscous *Klebsiella* variicola subsp. variicola causing primary endodontic infection. **Clinical Microbiology and Infection. 2021,** v. 27, n. 2, p. 303-304.

NATHAN, C. Resisting antimicrobial resistance. **Nature Reviews Microbiology.** 2020, v. 8, n. .5, p. 259-260.

NAVON-VENEZIA S, KONDRATYEVA K, CARATTOLI A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**. 2017, v. 41, n. 3, p. 252-275.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade do aminoglicosídeo. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**. 2006, v. 21, n. 4, p. 444-452.

PIPERAKI, E.T; SYROGIANNOPOULOS, G.A.; TZOUVELEKIS, L.S.; DAIKOS, G.L. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 2017, v. 36, n. 10, p. 1002-1005.

PITOUT, J. DD; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae,* a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** 2015, v. 59, n. 10, p. 5873-5884.

SALVATIERRA, C. M. Microbiologia Básica: bacilos gram-negativos. In: SALVATIERRA, Calbijo Mérida. Microbiologia: aspectos morfológicos, bioquímicos e metodológicos. São Paulo: Saraiva, 2016. Cap. 3. p. 41-82.

SANDLE, T. Microbial identification. **Pharmaceutical Microbiology**, 2016; 103–113.

SANTANA, S. I. L. **Caracterização molecular de bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenem isolados de amostras de água residual de ambiente hospitalar.** 2019. 43 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

SANTOS, W. M.; SECOLI, S. R. Economic burden of inpatients infected with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. **EINS Eistein** (São Paulo), n. 17, v. 4, 2019.

SEGERMAN B. The Most Frequently Used Sequencing Technologies and Assembly Methods in Different Time Segments of the Bacterial Surveillance and RefSeq Genome Databases. **Frontiers in Cellular and Infection** Microbiology. 2020. V. 19, n. 10, p. 527102.

SHON, AS.; BAJWA, RAJINDER, PS.; RUSSO, TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. **Virulence**. 2013, p. 107-118.

SRINIVASAN VB, RAJAMOHAN G. Comparative genome analysis and characterization of a MDR *Klebsiella* variicola. **Genomics.** 2020, v. 112, n. 5, p. 3179-3190.

TIRI, B.; SENSI, E.; MARSILIANI, V.; CANTARINI, M.; PRIANTE, G.; VERNELLI, C.; MARTELLA, L.A.; COSTANTINI, M.; MARIOTTINI, A; ANDREANI, P.; BRUZZONE, P.; SUADONI, F.; FRANCUCCI, M.; CIROCCHI, R.; CAPPANERA S. Antimicrobial Stewardship Program, COVID-19, and Infection Control: Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Colonization in ICU COVID-19 Patients. What Did Not Work? **Journal of Clinical Medicine.** 2020. v. 25, n. 9, p. 2744.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015. p. 296-297.

VANECI-SILVA, D. et al. *Klebsiella pneumoniae* causing mass mortality in juvenile Nile tilapia in Brazil: Isolation, characterization, pathogenicity and phylogenetic relationship with other environmental and pathogenic strains from livestock and human sources. Aquaculture 2022. v. 546, p. 737376.

VÁRADI L, LUO JL, HIBBS DE, PERRY JD, ANDERSON RJ, ORENGA S, GROUNDWATER PW. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. **Chemical Society Reviews.** 2017, v. 46, n. 16, p. 4818-4832.

VERDI, CM., ZIMMERMANN, CEP, ANDRADE, ENC; LEDUR PC; VELASQUEZ, PG. Detecção laboratorial dos mecanismos de resistência da *Klebsiella pneumoniae*: uma revisão. Revista de Saúde Integrada, v. 9, n. 7, p. 16-27, 2016.

VIEIRA, Mônica Aparecida Midolli. Ilhas de patogenicidade. O Mundo da Saúde, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 406-414, 4 dez. 2009. Centro Universitario Sao Camilo - Sao Paulo. http://dx.doi.org/10.15343/0104-7809.20094406414.

VOULGARI, E; ZARKOTOU O, RANELLOU K, KARAGEORGOPOULOS DE, VRIONI G, MAMALI V, THEMELI-DIGALAKI K, TSAKRIS A. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 2013, v. 68, p. 84–8.

WANGG.; ZHAO, G; CHAO, X; XIE, Longxiang; WANG, H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**. 2020. v. 17, n. 17,6278.

WOLFF, N. S.; JACOBS, M. C.; WIERSINGA, W. J.; HUGENHOLTZ, F. Pulmonary and intestinal microbiota dynamics during Gram-negative pneumonia-derived sepsis. **Intensive Care Medicine Experimental**. 2021 v. 9, n. 1., p. 1-14

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**, 2014.

WYRES KL, HOLT KE. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. **Trends in Microbiology.** 2016. V. 24, n. 12, p. 944-956.

WYRES KL, LAM MMC, HOLT KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology.** 2020, v. 18, n. 6, p. 344-359.

WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**. 2020, v. 18, n. 6, p. 344-359, 2020.

YU F, LV J, NIU S, DU H, TANG YW, PITOUT JDD, BONOMO RA, KREISWIRTH BN, CHEN L. Multiplex PCR Analysis for Rapid Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenem-Resistant (Sequence Type 258 [ST258] and ST11) and Hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) Strains. **Journal of Clinical Microbiology**. 2018, v. 56, n. 9, p. e00731-18.

Zagui GS, de Andrade LN, Moreira NC, Silva TV, Machado GP, da Costa Darini AL, Segura-Muñoz SI. Gram-negative bacteria carrying β-lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**. 2020. v. 192, n. 6, p. 376, 2020.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS E PUPAS DE CALLIPHORIDAE (DIPTERA) PÓS-ENTERRAMENTO: UMA REVISÃO DA LITERATURA E ESTUDO EXPERIMENTAL SOB A LUZ DA ENTOMOLOGIA FORENSE

Data de aceite: 01/02/2022

Data de submissão: 10/12/2021

Jéssica da Silva Costa
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Estudo de Dípteros
Rio de Janeiro - RJ
http://lattes.cnpq.br/8273577926430803

Adriana Leal de Figueiredo
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Estudo de Dípteros
Rio de Janeiro – RJ
http://lattes.cnpq.br/0688011900954906

Wellington Thadeu de Alcantara Azevedo
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Seropédica– RJ
http://lattes.cnpq.br/9262069823040625

Cláudia Soares Santos Lessa
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Estudo de Dípteros
Rio de Janeiro - RJ
http://lattes.cnpq.br/4334469598577165

Valéria Magalhães Aguiar
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Estudo de Dípteros
Rio de Janeiro - RJ
http://lattes.cnpq.br/0174838161539244

RESUMO: As ciências forenses são um campo de estudo focado na resolução de crimes. Uma de suas subdivisões é a entomologia forense, responsável por estudar insetos que façam parte das evidências em casos legais. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a influência do processo de enterramento pupal em três substratos (serragem, areia e terra) sobre a taxa de sobrevivência de dípteros da família Calliphoridae, bem como, analisar a produção científica publicada, evidenciando a relevância desta pesquisa para a entomologia forense. A revisão bibliográfica foi feita a partir de busca sistemática na base de dados CAPES, empregou-se palavras-chave como: "entomologia forense, enterramento de larvas e pupas, profundidade de enterramento" para a obtenção de artigos sobre a temática onde 36 artigos foram selecionados. Durante a etapa experimental, para *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830), foram testadas as profundidades de enterramento de três, seis e nove centímetros, para todos os substratos selecionados (serragem, areia e terra) e de quinze centímetros para terra e areia. Em *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), foram testadas as profundidades de três, seis, nove, quinze e vinte centímetros em serragem e três, quinze e vinte centímetros em terra e areia. As taxas de viabilidades para *C. putoria* em todos os substratos estudados e em todas as profundidades atingiram índices superiores a 86%. As viabilidades apresentadas por *C. megacephala* quando em serragem a três, seis, nove, quinze e vinte centímetros foram 99%, 99%, 100%, 97% e 73%, respectivamente. Considerando as altas taxas de emergência dos

indivíduos, entende-se que os substratos e profundidades analisadas não influenciaram as taxas de sobrevivência pupal de *C. putoria* ou *C. megacephala*, com exceção do experimento em serragem a vinte centímetros.
PALAVRAS-CHAVE: Intervalo pós-morte, Mosca-varejeira, Profundidade de enterramento, Viabilidade pupal.

POST-BURIAL SURVIVAL ANALYSIS OF CALLIPHORIDAE (DIPTERA) LARVAE AND PUPAE: A LITERATURE REVIEW AND EXPERIMENTAL STUDY IN THE LIGHT OF FORENSIC ENTOMOLOGY

ABSTRACT: Forensic science is a field of study focused on solving crimes. One of its subdivisions is Forensic Entomology, responsible for studying insects that are part of the evidence in legal cases. In this paper, we aimed to evaluate the influence of the pupal burial process in three substrates (sawdust, sand and soil) on the survival rate of diptera of the Calliphoridae family, as well as to analyze the published scientific production, highlighting the relevance of this research for forensic entomology. The literature review was based on a systematic search in the CAPES database, using keywords such as: "forensic entomology, burial of larvae and pupae, burial depth" to obtain articles on the subject, from which 36 articles were selected. During the experimental stage, for *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830), burial depths of three, six and nine centimeters were tested for all selected substrates (sawdust, sand and soil) and fifteen centimeters for soil and sand. For *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), burial depths of three, six, nine, fifteen and twenty centimeters were tested in sawdust and three, fifteen and twenty centimeters in soil and sand. The viability rates for *C. putoria* in all substrates studied and at all depths were higher than 86%. The viability rates for *C. megacephala* in sawdust at three, six, nine, fifteen and twenty centimeters were 99%, 99%, 100%, 97% and 73%, respectively. Considering the high emergence rates of individuals, it is understood that the substrates and depths analyzed did not influence the pupal survival rates of *C. putoria* or *C. megacephala*, with the exception of the experiment in sawdust at twenty centimeters.
KEYWORDS: Post-mortem interval, Blowfly, Depth of burial, Pupal viability.

1 | INTRODUÇÃO

A ciência forense é um campo de estudo focado na coleta de evidências para a solução de crimes. A entomologia forense tem se destacado nos últimos anos como subdivisão da ciência forense, sendo responsável por estudar artrópodes como evidência em casos legais (AMENDT *et al.*, 2006). No Brasil, poucos trabalhos foram publicados sobre o tema, havendo um crescimento em estudos apenas a partir de 1990, apesar de seu valor para investigações criminais (GOMES & VON ZUBEN, 2006).

O Intervalo post-mortem (ou IPM), constitui o tempo decorrido desde a morte do indivíduo até o momento que o corpo é encontrado (AMENDT *et al.*, 2006) e sua correta estimativa é de grande valor em investigações. Para calcular o IPM com base na entomologia, estima-se a idade dos insetos a partir do último estágio larval encontrado em

associação com o corpo, ou pela sucessão ecológica (BUGELLI e CAMPOBASSO, 2017).

Dentre os primeiros colonizadores de carcaças estão os dípteros sarcossaprófagos, definidos por Greenberg (1985) como os mais significativos para estimar o IPM. As famílias Calliphoridae e Sarcophagidae são as mais importantes para estimar o IPM, dada sua preferência por corpos frescos para postura de ovos, podendo esclarecer época e local da morte, a partir do estudo das larvas encontradas no corpo e no entorno (GOMES e VON ZUBEN, 2004).

O grupo Calliphoridae é diverso, com a biologia de suas espécies bem documentada por sua influência na vida humana. A diversidade de espécies e comportamentos pode levar a identificações imprecisas, sendo necessários mais estudos sobre a ecologia das espécies (THYSSEN, 2005). Apesar da importância para a entomologia forense de se entender profundamente dados acerca da profundidade de enterramento sobre a sobrevivência de dípteros, isto permanece como um tópico pouco estudado (BALME *et al.*, 2012).

Buscou-se elaborar uma revisão bibliográfica sobre o tema “enterramento de larvas e/ou pupas” e avaliar a influência do enterramento de pupas em diferentes profundidades (três, seis, nove, quinze e vinte centímetros) e substratos de pupariação (serragem, areia e terra rica em húmus) sobre a sobrevivência das espécies *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794).

2 I MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Revisão de Literatura

A base de dados Periódicos CAPES foi usada para a busca sistemática, pautada em palavras-chave referentes à temática: entomologia forense, enterramento de larvas e pupas, Calliphoridae, Intervalo pós-morte; em português e em inglês. O critério de inclusão foi a abordagem da importância do enterramento de larvas e pupas para a entomologia forense. Ao todo, 24 artigos foram selecionados para leitura integral, tendo sido publicados entre 1940 e 2020. Dentre os artigos, 19 são referentes às medidas de profundidade de enterramento e 5 aos fatores que possam influenciá-las.

2.2 Etapa Experimental

Para a formação da colônia estoque de insetos foram feitas coletas na antiga Fundação Jardim Zoológico da Cidade do Rio de Janeiro, atual BioParque, no bairro de São Cristóvão. Seguindo o modelo de Mello et al. (2007) e Ferraz e Aguiar-Coelho (2008), confeccionaram-se duas armadilhas que ficaram expostas por 48 horas, contendo 400g de sardinha descongelada em geladeira 24 horas antes. Os insetos capturados foram levados ao Laboratório de Estudo de Dípteros (LED), Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP) do Instituto Biomédico (IB), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), onde o estudo foi desenvolvido, para identificação, seguindo a

chave taxonômica de Mello (2003). Seguiu-se a metodologia proposta por Dallavecchia et al. (2010) para criação, mantendo-se os dípteros em gaiolas confeccionadas a partir de recipientes plásticos e alimentando-os diariamente com mel a 50% e água. Usou-se moela de frango como dieta larval, na proporção de 1 Larva/grama de dieta, e substrato para postura dos ovos.

Três substratos foram escolhidos: serragem, areia de margem de rio e terra rica em húmus. A areia e a terra foram coletadas em propriedade particular da APA da Bacia do Rio São João, região Leste do estado do Rio de Janeiro. A serragem foi obtida em estabelecimento comercial que processa e vende madeira no bairro Centro do Rio de Janeiro. Diferentes profundidades de enterramento foram testadas, sendo feitos experimentos a 3, 6 e 9 cm nos três substratos com *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830), e a 15 cm em areia e terra. *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) foi testada a 3, 6, 9, 15 e 20 cm em serragem e 3, 15 e 20 cm em areia e terra.

Três repetições com 40 pupas recém-formadas foram feitas para todas as profundidades, exceto 20 cm, onde realizaram-se seis repetições com 20 pupas cada. Tubos de ensaio de 2,5 cm de diâmetro e 15 cm de comprimento foram preenchidos com os substratos até cerca de 2 cm, em seguida, pupas foram colocadas e enterradas com o substrato, até se atingir as alturas de 3, 6, 9 ou 15 cm, sendo as pupas previamente pesadas em balança analítica. Os tubos foram vedados com tecido de náilon e elástico. Para a profundidade de 20 cm um recipiente transparente com capacidade para dois litros foi preparado, onde se inseriram as pupas, cobertas com os substratos até a altura de 20 cm. Nos testes utilizando serragem e areia com *C. putoria*, os tubos foram acomodados em câmara climatizada (Thelga/TF35A), regulada a 27°C durante o dia e 25°C durante a noite, 60 ±10% de umidade relativa do ar e 14 horas de fotoperíodo, iniciadas às 6 horas da manhã.

A avaliação do crescimento pupal no substrato terra foi desenvolvida em capela de criação de larvas (CARNEIRO *et al.*, 2020), com temperatura e umidade relativa registradas em termohigrógrafo. A temperatura e umidade relativa do ar médias registradas foram de 20,4°C e 78,25%. Nos experimentos com *C. megacephala*, foram registradas as temperaturas médias e umidades relativas médias de 19,9°C e 63,7% (serragem a 3, 6, 9 e 15 cm) e de 25,4°C e 78,2% (serragem a 20 cm), 25,3°C e 74,1% para areia e 22,1°C e 64,4% para terra. O teste de Shapiro-Wilk, a nível de significância (α) = 0,05, foi utilizado na avaliação da normalidade dos dados. Foram utilizados o teste de Wilcoxon e o teste T para analisar diferenças significativas entre duas características selecionadas (substrato e profundidade) e o teste Kruskal-Wallis para análise da influência da profundidade e do substrato sobre a emergência das pupas.

3 | RESULTADOS

3.1 Revisão bibliográfica

Travis, Knipling e Brody (1940), estudaram a dispersão larval e profundidade de enterramento para fixar parâmetros de tratamento do solo infestado com *Cochliomyia* (Townsend, 1915). As pupas enterradas foram encontradas nos primeiros 5,08 cm do solo e larvas de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) preferiram certos tipos de solo. Ullyett (1950) notou que larvas de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) se enterram a partir de 5,0 cm e preferem substrato arenoso, enquanto *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) empupam na superfície. Quinze anos depois, Norris (1965) revisou comparativamente a ecologia de califorídeos e ratificou os estudos de Travis, Knipling e Brody, (1940).

Vogt e Woodburn (1982) liberaram larvas de *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) em diferentes solos úmidos: um finamente triturado e outro inalterado e viu que as larvas se enterraram a uma média de 2,5 cm. Warman e Lewis (1997) investigaram o efeito do regime de luz no desenvolvimento de *L. cuprina* para elucidar se este fator regularia o enterramento. Larvas criadas em fotoperíodo de 12:12h (luz/escuridão) enterram-se a uma média de 5,7 cm; quando expostas à 18:6h (luz/escuridão), a média ficou em 10 cm.

Nesta década, muitos estudos com arenas circulares foram realizados pois estas refletem melhor o ambiente em que as larvas são encontradas na natureza (GOMES, SANCHES e VON ZUBEN, 2007). O primeiro estudo foi de Gomes, Von Zuben e Sanches (2003), onde utilizou-se uma arena circular de 50 cm de diâmetro forrada com 20 cm de serragem e colocou-se larvas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para observar o desenvolvimento em locais de mobilidade restrita. Notou-se homogeneidade no enterramento, com quase todos os indivíduos encontrados a partir de 10 cm. Posteriormente, Gomes e Von Zuben (2004) utilizaram uma arena de mesma medida, pondo-se larvas de *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) em seu centro para se dispersarem. A maior parte das larvas empupou a profundidades maiores que 12 cm. Com uma arena de mesmas dimensões, Gomes e Von Zuben (2005) a preencheram com aparas de madeira para estudar a dispersão larval de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), obtendo média de profundidade entre 9,91 cm e 12,97 cm, aproximadamente.

Para estudar a mortalidade larval e pupal de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) durante o inverno, Pitts e Wall (2005) colocaram larvas em estado de diapausa, em tubos de 100 cm de comprimento por 10 cm de diâmetro, preenchidos por serragem. Analisando o número de indivíduos, viu-se que a maioria (72,7%) se enterrou nos primeiros 10 cm do solo. Uma arena circular foi coberta com 40 cm de aparas de madeira, para estudar o enterramento, dispersão larval e padrão de distribuição de frequência em *C. megacephala* e *C. albiceps*. Viu-se que *C. megacephala* formou pupas a uma média de 11 cm e *C. albiceps* a 9,8 cm (GOMES, SANCHES e VON ZUBEN, 2005).

Gomes *et al*. (2006) analisou o efeito do fotoperíodo sobre profundidade de enterramento em *C. megacephala*. Larvas de terceiro instar foram postas em tubos de ensaio escuros com vermiculita, sendo expostas a ciclos de luz:escuridão de 0:24h, 12:12h e 24:0h. Viu-se que a profundidade aumentou, variando conforme o fotoperíodo, com médias de 3,1 cm para 0:24h, 4,3 cm para 12:12h e 8 cm para 24:0h. No ano seguinte, Gomes, Sanches e Von Zuben (2007) retomaram os testes com arenas e puseram carne bovina macerada para *C. megacephala* e *C. albiceps* empuparem em arena com raspas de madeira até 20 cm. Ambas empuparam a partir de 10 cm.

Gomes *et al*. (2007) discutiram possíveis efeitos do substrato na pupariação e dispersão de *C. albiceps* e observaram que, em vermiculita, a maior parte das larvas atingiu profundidade média entre 4 e 8 cm, evidenciando o efeito de diferentes substratos sobre o enterramento, já que a espécie atingiu menores profundidades do que em estudos anteriores com outros substratos (GOMES, SANCHES e VON ZUBEN, 2005; GOMES e VON ZUBEN, 2005). Gomes *et al*. (2009) continuaram a estudar a vermiculita como substrato de pupariação em *C. albiceps*. A profundidade máxima para a pupariação era de 5 cm e apenas 5% das larvas estavam neste intervalo. Gomes, Gomes e Von Zuben (2009) testaram o efeito de diferentes temperaturas no enterramento de *C. albiceps* e *L. cuprina*. *Lucilia cuprina* se enterrou superficialmente em temperaturas médias de 20ºC e *C. albiceps* preferiu temperaturas medianas.

Pires *et al.* (2010) verificaram que a média de profundidade de enterramento para *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) em arena de 10 cm de profundidade variou de 6 a 8 cm. No ano seguinte, Lewis e Benbow (2011) utilizaram uma carcaça de suíno para estudar a dispersão de *Phormia regina* (Meigen, 1826), constatando que a espécie tendeu a se dispersar para longe da carcaça e formar agregados larvais a uma média de 1-6 cm de profundidade, possivelmente devido às chuvas ocorridas à época do experimento, que teriam encharcado o solo.

Gunn e Bird (2011) enterraram iscas de fígado e sangue de porco para testar a habilidade de califorídeos em colonizar restos mortais enterrados. O estudo mostrou que o grau de compactação do solo influencia o enterramento. Nenhuma mosca colonizou iscas enterradas em solo compactado entre 5 e 10 cm. *L. sericata* foi encontrada nos primeiros 2 cm e *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758) formou pupas a até 8 cm, preferindo solos mais soltos. Finalizando a lista, Pastula e Merritt (2013) enterraram carcaças de suíno a duas profundidades, 30 cm e 60 cm, para estudar a sucessão ecológica e composição faunística. Califorídeos foram os primeiros colonizadores, com *P. regina* e *Lucilia coeruleiviridis* (Macquart 1855), encontradas a 30 cm de profundidade. Dípteros também foram encontrados na carcaça a 60 cm, porém nenhum pertencente à família Calliphoridae.

3.2 Resultado do estudo experimental

O teste de Shapiro-Wilk não mostrou distribuição normal entre as espécies (p =

8,841^{-06}), o de Wilcoxon indicou diferença significativa na emergência entre espécies (p = 0,007688) e o de Kruskal-Wallis indicou influência na emergência entre as espécies para profundidade (p = 0,0475) e substrato (p = 0,02451), comparando-se cada profundidade.

Comparando a viabilidade pupal de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) a 3 cm, viu-se que o teste T indicou diferença significativa entre pupas de C. putoria no substrato terra e C. megacephala em serragem e terra, quando comparadas. A 6 cm não se verificou diferenças significativas. A 9 cm houve diferença significativa entre o experimento com o substrato composto de terra para *C. putoria* e o experimento com serragem para *C. megacephala*. Nas comparações a 15 cm, o teste T indicou diferença significativa entre o substrato formado por areia, para *C. putoria* e os formados por terra e serragem para *C. megacephala*. Não foi possível estabelecer comparação entre as espécies a 20 cm pois não foram realizados testes para *C. putoria.*

O teste de Kruskal-Wallis não indicou influência na emergência dos dípteros mediante as variáveis profundidade (p = 0,2075) e substrato (p = 0,5839), atingindo-se taxas de viabilidade pupal acima de 86% (Tabela 1). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado nos substratos para verificar sua possível influência na emergência de pupas, separadamente, e viu-se que não há influência em serragem (p = 0,496), areia (p = 0,1165) e terra (p = 0,1469).

	Profundidade (cm)			
Substrato	3	6	9	15
Serragem	91a	91a	95a	-
Areia	89a	96a	86a	89a
Terra	88a	95a	87a	95a

Tabela 1 – Viabilidade de pupas de *Chrysomya putoria* após enterramento.

Fonte: Costa et al., 2021.

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Kruskal-Wallis a nível de 5% de significância.

O teste de Kruskal-Wallis indicou influência na emergência dos dípteros mediante profundidade (p= 0,0004437) e substrato (p = 0,02839) para o teste com serragem e a menor viabilidade (73%) ocorreu entre as pupas enterradas a 20 cm. Nos demais substratos, os substratos areia (p = 0,1968) e terra (p = 0,1936) não mostraram influência na emergência, com taxas de viabilidade pupal acima de 87% em enterramentos a 3, 15 e 20 cm (Tabela 2).

Substrato	Profundidade (cm)				
	3	6	9	15	20
Serragem	99a	99a	100a	97a	73b
Areia	92a	-	-	93a	87a
Terra	98a	-	-	98a	94a

Tabela 2 – Viabilidade de pupas de *Chrysomya megacephala* após enterramento.

Fonte: Costa et al., 2021.

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Kruskal-Wallis a nível de 5% de significância.

4 I DISCUSSÃO

O estágio pupal sofre influência de fatores bióticos e abióticos que podem interferir na nutrição larval, crescimento, tamanho pupal e viabilidade deste estágio (THYSSEN, 2005). Os substratos analisados não influenciaram a emergência e sobrevivência de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), considerando as profundidades estudadas, pois, segundo os resultados, as taxas de emergência foram consideradas elevadas (acima de 86%), exceto no enterramento em serragem a 20 cm, onde viu-se diferença significativamente inferior (73%), sendo, porém, ainda considerada uma taxa de sobrevivência elevada (acima de 70%), indicando alta resistência desses insetos ao enterramento.

Outros fatores podem causar variações na taxa de sobrevivência de Calliphoridae. Tudo isto (os resultados obtidos e uma compreensão mais profunda sobre os fatores influenciadores) se torna de suma importância, tendo em vista a correta determinação do IPM e produção de provas criminais. Thyssen (2005) e Chaves (2016) concordam que é importante aprimorar os conhecimentos sobre a biologia de califorídeos e atingir níveis cada vez mais específicos. Embora a profundidade não tenha influenciado a sobrevivência, outros aspectos do solo relativos ao processo de enterramento podem afetar as larvas e pupas. Alguns fatores serão discutidos mais profundamente a seguir:

Gomes *et al.* (2007) e Gomes, Von Zuben e Sanches (2003), observaram ao utilizar vermiculita como substrato, que larvas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) tendem a se enterrar superficialmente, mesmo que a profundidade de enterramento permitida seja grande. Hipotetizou-se que um provável fator para isto seja a maior granulometria da vermiculita, que limitaria a movimentação das larvas. Pires *et al.* (2010), demonstraram que a serragem úmida limitou a dispersão larval de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), atingindo a profundidade de 10 cm. Para Norris (1965), pré-pupas e pupas seriam sensíveis ao nível de umidade no solo e isto refletiria nas taxas de sobrevivência e comportamento das larvas.

Gunn e Bird (2011) constataram que *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Calliphora vicina* (Rob-Desvoidy, 1830) e *L. sericata* têm a postura de ovos limitada em

substratos mais soltos. Em solo não-compactado, a maioria das pupas de *C. vomitoria* foram encontradas nos primeiros 5 cm de solo e *L. sericata,* próxima à superfície, demonstrando que a compactação do solo pode alterar a profundidade de enterramento. Nenhum indivíduo colonizou iscas em substrato descompactado a 20 cm ou ovipôs em solo compactado a 5 e 10 cm. Isto pode impedir a colonização de cadáveres enterrados, levando a uma incorreta estimativa do IPM. Neste estudo, *C. putoria* apresentou diminuição na viabilidade pupal em areia e terra, enquanto *C. megacephala* apresentou diminuição em areia, possivelmente devido à maior compactação destes.

Warman e Lewis (1997) expuseram larvas de *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) a diferentes fotoperíodos: larvas expostas a uma fotofase de 18:6 h (luz/escuro) durante o terceiro instar se enterraram a uma média de 10 cm, ao passo que larvas expostas a 12:12 h (luz/escuro) se enterraram a uma média de 3,4 cm. Com os resultados, descobriram que a quantidade de horas de exposição à luz parece estar envolvida na regulação da profundidade de enterramento.

Gomes *et al*. (2006) expuseram *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) a um regime de fotofase de ciclos de luz:escuro de 0:24 h, 12:12 h e 24:0 h. As larvas enterraram-se a uma média de 3 cm no menor período de luz e a 5 cm durante o maior período, reafirmando a tendência a um enterramento mais profundo com o aumento da fotofase, o que parece ser uma estratégia evolutiva de prevenção contra a dessecação ocorrida em dias mais quentes.

Gomes *et al*. (2006) associa a temperatura como um dos mais importantes fatores a agir sobre o enterramento, com certas espécies de moscas apresentando preferência por dado clima e temperatura. Larvas de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) em condições desfavoráveis entram em diapausa, enterrando-se mais profundamente no solo, demonstrando regulação comportamental do enterramento (PITTS e WALL, 2005). *Chrysomya putoria* é originária da África Central e ocorre apenas a temperaturas acima de 26,7°C, já *Chrysomya megacephala* não é tão especialista, tolerando condições adversas e temperaturas variadas (BAUMGARTNER e GREENBERG, 1984). Neste estudo, *C. megacephala* foi mais resistente, com maior taxa de sobrevivência. Hipotetiza-se que as espécies tenham preferência por certa temperatura do solo para pupariação, cavando superficialmente ou profundamente.

Competição e predação entre espécies podem ser mecanismos reguladores, já que o estágio pupal é relativamente longo, deixando o indivíduo exposto. A competição larval por recursos também pode afetar sua sobrevivência (NORRIS, 1965). Califorídeos são suscetíveis a ataques pelo parasita *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) e alguns membros da família desenvolveram estratégias para proteção. Dentre elas, *Lucilia sericata* se enterra profundamente no substrato, já que *N. vitripennis* não possui a habilidade de adentrá-lo. Outras espécies menos suscetíveis ao parasita não demonstraram este comportamento, exibindo menor taxa de sobrevivência (ULLYETT, 1950).

É importante levar em conta o processo de dispersão larval em investigações por afetar localização e sobrevivência das pupas, influenciando o IPM (GOMES e VON ZUBEN, 2004). Dispersão larval a longas distâncias pode ser uma estratégia evolutiva, na tentativa de escapar de predadores (NORRIS, 1965). Gomes *et al.* (2007) observaram em estudo sobre dispersão que a maioria das pupas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) foram encontradas entre 4 e 8 cm, apesar do limite para enterramento de 20 cm, mostrando que, com profundidade e dispersão limitadas, as larvas não se enterraram a maiores profundidades.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o observado por diferentes autores, infere-se que diversos fatores regem a profundidade de enterramento e sobrevivência. Neste estudo, a profundidade de enterramento larval variou por espécie e substrato. Os substratos serragem, areia e terra não influenciaram a sobrevivência de pupas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) enterradas a qualquer profundidade, logo, para seu uso na entomologia forense, recomenda-se procurar por pupas enterradas na circunvizinhança do cadáver até, pelo menos, vinte centímetros de profundidade nos substratos testados, o que permitirá utilização mais confiável das informações obtidas a partir das larvas e pupas para estimar o IPM e na entomologia forense.

REFERÊNCIAS

AMENDT, J.; CAMPOBASSO, C.P.; GAUDRY, E.; REITER, C.; LEBLANC, H.N.; HALL, M.J.R. Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine*, v.121, p.90–104, 2007.

BALME, G.R.; DENNING, S.S.; CAMMACK, J.A.; WATSON, D.W. Blow flies (Diptera: Calliphoridae) survive burial: Evidence of ascending vertical dispersal. *Forensic Science International*, v.216, p.e1–e4, 2012.

BAUMGARTNER, D.L.; GREENBERG, B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *Journal of Medical Entomology*, v.21, p. 105–113, 1984.

BUGELLI, V.; CAMPOBASSO, C.P. Basic research and applied science in forensic entomology. *Science & Justice*, v.57, p.157–158, 2017.

CARNEIRO, L.T.; AZEVEDO, W.T.A.; AGUIAR, V.M.; COURI, M.S. The nocturnal ovipositon behavior of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in Brazil and its forensic implications. *Journal of Medical Entomology,* v.58, p.1–9, 2020.

CHAVES, B.O. Fatores que interferem na estimativa do intervalo pós-morte ao utilizar a entomologia forense. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília.

DALLAVECCHIA, D.L.; SILVA-FILHO, R.G.; FIGUEIREDO, N.M.A.; AGUIAR-COELHO, V.M. Esterilização da superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para utilização em biodesbridamento. *Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental OnLine*, v.2, p.1–4, 2010.

FERRAZ, A.C.P.; AGUIAR-COELHO, V.M. Desenvolvimento e avaliação de novas metodologias para testar a atratividade de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) a estímulo visual por cores em condições laboratoriais. *Neotropical Entomology*, v.37, p.334–337, 2008.

GOMES, L.; GOMES, G.; OLIVEIRA, H.G.; JUNIOR, J.J.M.; VON ZUBEN, C.J.; SANCHES, M.R. Análise do efeito do tipo de substrato para pupação na dispersão larval pós-alimentar em *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Zoociências*, v.9, p.67–73, 2009.

GOMES, L.; GOMES, G.; OLIVEIRA, H.G.; SANCHES, M.R.; VON ZUBEN, C.J. Influence of photoperiod on body weight and depth of burrowing in larvae of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) and implications for forensic entomology. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.50, p.76-79, 2006.

GOMES, L.; GOMES, G.; OLIVEIRA, H.G.; VON ZUBEN, C.L; DA SILVA, I.M.; SANCHES, M.R. Efeito do tipo de substrato para pupação na dispersão larval pós-alimentar de *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). Iheringia, *Série Zoologia*, v.97, p.239–242, 2007.

GOMES, L.; GOMES, G.; VON ZUBEN, C.J. The influence of temperature on the behavior of burrowing in larvae of the blowflies, *Chrysomya albiceps* and *Lucilia cuprina*, under controlled conditions. *Journal of Insect Science*, v.9, p.1–6, 2009.

GOMES, L.; SANCHES, M.R.; VON ZUBEN, C.J. Behavior of the combined radial post-feeding larval dispersal of the blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) and implications for forensic entomology. B*razilian Archives of Biology and Technology*, v.50, p.279–288, 2007.

GOMES, L.; SANCHES, M.R.; VON ZUBEN, C.J. Dispersal and burial behavior in larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). *Journal of Insect Behavior,* v.18, p.281–292, 2005.

GOMES, L; VON-ZUBEN, C.J. Dispersão larval pós-alimentar em *L. cuprina* (Diptera, Calliphoridae): profundidade, peso e distância de enterramento para pupação. Iheringia, *Série Zoológica*, v.94, p.135–138, 2004.

GOMES, L.; VON ZUBEN, C.J. Forensic Entomology and Main Challenges in Brazil. *Neotropical Entomology*, v.35, p.1–11, 2006.

GOMES, L.; VON ZUBEN, C.J. Postfeeding radial dispersal in larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology. *Forensic Science International*, v.155, p.61–64, 2005.

GOMES, L.; VON ZUBEN, C.J.; SANCHES, M.R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v.47, p. 229–234, 2003.

GREENBERG, B. Forensic Entomology: Case Studies. *Bulletin of the Entomological Society of America*, v.31, p.25–28, 1985.

GUNN, A.; BIRD, J. The ability of the blowflies *Calliphora vomitoria* (Linnaeus), *Calliphora vicina* (Rob-Desvoidy) and *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) and the muscid flies *Muscina stabulans* (Fallén) and *Muscina prolapsa* (Harris) (Diptera: Muscidae) to colonise buried remains. *Forensic Science International*, v.15, p.198–204, 2011.

LEWIS, A.J.; BENBOW, M.E. When entomological evidence crawls away: *Phormia regina* en masse larval dispersal. *Journal of Medical Entomology*, v.48, p.1112–1119, 2011.

MELLO, R.P. Chave para a identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomologia y Vectores*, Rio de Janeiro, v. 10, p. 255-268, 2003.

MELLO, R.S.; QUEIROZ, M.M.C.; VALGODE, M.A.; AGUIAR-COELHO, V.M. Population fluctuations of calliphorid species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia*, Rio Grande do Sul, v.97, p.1–5, 2007.

NORRIS, K.R. The Bionomics of blow flies. *Annual Review of Entomology*, v.10, p.47–68, 1965.

PASTULA, E.C.; MERRIT, R.W. Insect arrival pattern and succession on buried carrion in Michigan. *Journal of Medical Entomology*, v.50, p.432–439, 2013.

PIRES, S.M.; ZIMMER, C.R.; CARCAMO, M.C.; RIBEIRO, P.B. Dispersão larval pós-alimentar de *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae) em condições de laboratório. *Iheringia, Série Zoológica*, v.100, n.3, p.254–258, 2010.

PITTS, K.; WALL, R. Winter survival of larvae and pupae of the blowfly, *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research*, v.95, p.179–186, 2005.

THYSSEN, P.J. Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de Califorídeos (Diptera) de importância forense. 2005. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

TRAVIS, B.V.; KNIPLING, E.F.; BRODY, A.L. Lateral migration and depth of pupation of the larvae of the primary screwworm *Cochliomyia americana* C. and P. *Journal of Economic Entomology*, v.33, p.847–850, 1940.

ULLYETT, G. Pupation habits of sheep blowflies in relation to parasitism by *Mormoniella vitripennis*, Wlk. (Hym., Pteromalid.). *Bulletin of Entomological Research*, v.40, p.533–537, 1950.

VOGT, W.G.; WOODBURN, T.L. Dispersal of post-feeding larvae of *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Journal of the Australian Entomological Society*, v.21, p.289–291, 1982.

WARMAN G.R.; LEWIS, R.D. Description of the photoperiodic control of larval burrowing in the blowfly *Lucilia cuprina*: a novel index for photoperiodic research. *Chronobiology international*, v.14, p.247–52, 1997.

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 15/12/2021

Maura Harumi Sugai-Guerios
Universidade Positivo (UP)
Curitiba – Paraná
http://lattes.cnpq.br/6850585122363619

João Vitor Rodrigues Pereira
Universidade Positivo
Curitiba – Paraná
http://lattes.cnpq.br/0854928948949973

Marcela Moreira Albuquerque
Universidade Positivo
Curitiba – Paraná
http://lattes.cnpq.br/8225878481911350

Willyan Alex Prochera Clausen
Universidade Positivo (UP)
Curitiba – Paraná
http://lattes.cnpq.br/7222136086516988

Paula Regina Cogo Pereira
Universidade Positivo (UP)
Curitiba – Paraná
http://lattes.cnpq.br/8819104997028750

Karla Emanuele Costa Rosa
Universidade Positivo (UP)
Curitiba – Paraná
http://lattes.cnpq.br/5002413289658429

Lígia Alves da Costa Cardoso
Universidade Positivo (UP)
Curitiba – Paraná
http://lattes.cnpq.br/5655205350391160

Thabata Maria Alvarez
Universidade Positivo (UP)
Curitiba – Paraná
http://lattes.cnpq.br/5098256501937905

RESUMO: As leveduras utilizadas para a produção de cerveja devem ser capazes de metabolizar alguns dos carboidratos presentes no mosto cervejeiro e produzir bons aromas e sabores durante a fermentação, podendo ou não resultar na produção de etanol. O uso de leveduras não-*Saccharomyces* para a produção de cerveja pode resultar em produtos com características diferenciadas, uma vez que as leveduras são os principais determinantes para o perfil de compostos voláteis da cerveja, agregando à diversidade de sabores e aromas em cervejas comercializadas. Existem diversas fontes das quais é possível isolar leveduras, como frutas, amostras de solo, cascas de árvore e outras bebidas fermentadas. Com o intuito de obter leveduras com características desejáveis para a produção de cerveja, são empregados métodos de seleção durante ou após o isolamento, seguidos de metodologias de caracterização para avaliar seus atributos e, consequentemente, a viabilidade das cepas obtidas para a produção de cerveja. O objetivo do presente trabalho consistiu em compilar e comparar metodologias de seleção e caracterização usadas durante o processo de obtenção e escolha de leveduras para a produção de cerveja. Conclui-se que as metodologias empregadas devem ser compatíveis com o número de cepas a serem testadas, orçamento e equipamentos disponíveis

e, principalmente, com o processo cervejeiro e tipo de cerveja a ser produzida, por exemplo, com base no seu amargor e teor alcóolico.
PALAVRAS-CHAVE: Bioprospecção. Etanol. Leveduras não-convencionais. Lúpulo. Maltose.

EVALUATION OF METHODS FOR THE SELECTION AND CHARACTERIZATION OF ISOLATED BREWING YEASTS

ABSTRACT: Yeasts used for brewing must be able to metabolize some of the carbohydrates present in the brewer's wort and produce good aromas and flavors during the fermentation, with or without the production of ethanol. The use of non-*Saccharomyces* yeasts for brewing may result in products with differentiated characteristics, since yeasts are the main contributor to the resulting volatile profile of the beer, adding to the diversity of flavors and aromas. There are several sources from which yeasts can be isolated, such as fruits, soil samples, tree bark and other fermented beverages. In order to obtain yeasts with desirable characteristics for beer production, selection methods are used during or after isolation, followed by characterization methodologies to assess their attributes and, consequently, the viability of the strains obtained for beer production. The aim of this study consisted in compiling and comparing selection and characterization methodologies used during the process of obtaining and choosing yeast species for beer production. In conclusion, the methodologies used should be compatible with the number of strains to be tested, with the budget and equipment available and, specially, with the brewing process and the type of beer to be produced, for example, its bitterness and alcohol concentration.
KEYWORDS: Bioprospecting. Ethanol. Hop. Non-conventional yeasts. Maltose.

1 | INTRODUÇÃO

A cerveja é produzida pela fermentação por leveduras do mosto cervejeiro, que é obtido a partir de malte de cereais e lúpulo. As características da cerveja, incluindo o sabor, variam de acordo com os cereais utilizados na maltagem, o tipo de extrato de lúpulo e as leveduras utilizadas, e as condições de processo de cada uma destas etapas, como temperatura e duração (DURELLO *et al.*, 2019). Ao longo dos anos, foram selecionadas leveduras que demonstraram características desejáveis para a fabricação de cerveja, como: a produção de sabores e aromas agradáveis; a capacidade de utilizar maltose e maltotriose, a não produção de toxinas; a capacidade de produzir e tolerar etanol; e a tolerância às condições do processo fermentativo (CAPECE *et al.*, 2018). Estas leveduras foram intituladas convencionais para a produção de cerveja e geralmente englobam todas as espécies de *Saccharomyces* e algumas espécies frequentemente utilizadas na indústria de alimentos, como *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces lactis* (SANNINO *et al.*, 2019; SIBIRNY, SCHEFFERS, 2002).

A demanda crescente por cervejas com baixo teor alcoólico ou com sabores e aromas diferenciados incentiva a busca por leveduras não convencionalmente utilizadas na produção de cerveja, em especial por espécies não pertencentes ao gênero

Saccharomyces (CAPECE *et al*., 2018; OSBURN *et al*., 2016; BASSO *et al*., 2016), como *Zygosaccharomyces bailii* (BELLUT *et al*., 2018), *Lachancea fermentati* (BELLUT *et al*., 2020), *Wickerhamomyces anomalus* (CAPECE *et al*., 2018), *Kloeckera apiculata* (ESTELA-ESCALANTE *et al*., 2018) e *Brettanomyces anomalus* (MICHEL *et al*., 2016). Seu uso como iniciadores de fermentação ainda é raro, sendo usualmente utilizadas de modo conjunto com outras espécies de *Saccharomyces*, em processos de cofermentação ou fermentação sequencial (CHEN, 2011; HOLT *et al*., 2018). Os aromas e sabores produzidos por estas leveduras incluem: álcool amílico e 2-feniletanol, de aroma frutado (CAPECE *et al*., 2018); hexanoato de etila, com sabor semelhante a maçã e frutas (CANONICO *et al*., 2016); 1-nonanol, 2-heptanol e 2-nonanol, de sabor frutado (BELLUT *et al*., 2018). Sannino *et al*. (2019) apresentam uma revisão sobre os aromas produzidos por leveduras não-convencionais aplicadas à produção de cerveja.

Existem diversas fontes das quais podem ser isoladas leveduras não-convencionais, como bebidas fermentadas, frutas, cascas de árvores e solo (SNIEGOWSKI *et al*., 2002; GUTIÉRREZ *et al*., 2018). Este isolamento é normalmente realizado através de etapas de diluição seriada e plaqueamento, sendo possível incluir uma etapa de enriquecimento, que consiste no uso de meios de cultivo que promovem o crescimento das cepas com características desejadas, sendo usado quando a concentração dessa cepa na amostra é baixa ou desconhecida (GRIJALVA-VALLEJOS *et al*., 2020; OSBURN *et al*., 2018). Após o isolamento, as cepas devem ser caracterizadas e selecionadas de acordo com as características visadas pelos pesquisadores.

Neste contexto, o objetivo desta revisão é compilar e comparar diferentes metodologias de seleção e caracterização, considerando os objetivos e os equipamentos utilizados em cada uma, visando facilitar a escolha da metodologia adequada para a bioprospecção de leveduras a serem utilizadas em processos de produção de cerveja.

2 | ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA

O modo mais comum para a recuperação de microrganismos é o método de isolamento por plaqueamento. As variações na metodologia são relativas às amostras usadas como ponto de partida; à presença ou à ausência de etapa de enriquecimento; aos métodos utilizados para o enriquecimento, caso este seja realizado; à composição dos meios de cultivo usados no plaqueamento; e às condições das etapas de incubação. Gutiérrez *et al*. (2018) e Cubillos *et al*. (2019) apresentam uma relação de tipos de amostras que já foram utilizadas no isolamento de leveduras para produção de cerveja, como líquens, frutos, grãos e outros produtos fermentados.

Tanto para a etapa de enriquecimento quanto para a etapa de plaqueamento, existem diferentes metodologias que variam de acordo com as características desejadas

para a levedura e com o tipo de amostra. Por exemplo, é importante que seja usado um método de seleção que iniba o crescimento de bactérias, favorecendo o isolamento de leveduras. Para isso, é comum suplementar o meio com um antibacteriano, como o cloranfenicol (GRIJALVA-VALLEJOS *et al*., 2020; LAITILA *et al*., 2007). Alternativamente, Cubillos *et al*. (2019) sugerem a adição de etanol ou acidificação do pH do meio, o que reduz o crescimento das bactérias, porém, também reduz a diversidade de cepas de leveduras capazes de crescer no meio (ROSSO *et al*., 1995; RUSSELL; DIEZ- GONZALEZ, 1997).

Outro método de seleção frequentemente empregado consiste na utilização de meios de cultivo com composições que simultaneamente limitam o crescimento de cepas indesejadas e oferecem condições que beneficiam apenas as cepas que são de interesse na pesquisa, simulando as condições do processo fermentativo. Podem ser utilizados como meio de cultivo, por exemplo, o mosto cervejeiro (BELLUT *et al*., 2018) ou um meio de cultivo sintético suplementado com etanol, como o meio YPD8E5 (1% extrato de levedura, 2% peptona, 8% glicose e 5% etanol), proposto por Osburn *et al*. (2016) e utilizado durante o enriquecimento de amostras por Barry *et al*. (2018).

O trabalho de Barry *et al*. (2018) é um exemplo de isolamento utilizando etapas enriquecimento, visando leveduras para produção de hidromel. Com o intuito de selecionar leveduras tolerantes ao etanol, utilizaram uma metodologia adaptada de Osburn *et al*. (2016), na qual as amostras foram enriquecidas através de incubação em meio líquido YPD8E5 a 30 °C com aeração por 24 h, avaliando o crescimento dos microrganismos através da observação de turbidez no meio, seguida de plaqueamento em meio WLN (Wallerstein Laboratories Nutriente). As amostras utilizadas como fonte de prospecção foram mel, favo, própolis, fragmentos de colmeia e abdômen rompido de abelha, no entanto, somente na amostra de abdômen foi possível isolar leveduras devido à baixa carga microbiana das demais amostras. Dessa forma, Barry *et al*. (2018) obtiveram duas cepas de *Torulaspora delbrueckii*.

Barry *et al*. (2018) testaram estas cepas obtidas em fermentação de mel diluído e de mosto cervejeiro, usando uma cepa de laboratório de *S. cerevisiae* como controle. No mel diluído, ambas as cepas tiveram crescimento mais lento do que a cepa controle, mas, atingiram teor alcóolico semelhante, aproximadamente 11 % (v/v), o que indica que o método de enriquecimento utilizado permitiu o isolamento de cepas que tolerassem etanol. Por outro lado, a concentração de etanol na fermentação de mosto cervejeiro não passou de 1 % (v/v), uma vez que as cepas não eram capazes de metabolizar maltose, o que é necessário para obtenção de etanol no mosto. Barry *et al*. (2018) apresentaram dois motivos para este resultado: as leveduras são oriundas de amostras que não contém maltose; e não foi realizada uma seleção por leveduras capazes de fermentar maltose, uma vez que a fonte de carbono no meio de enriquecimento era glicose. Para que a bioprospecção seja bem-sucedida, Barry *et al*. (2018) ressaltam a importância de definir os métodos de seleção com base nos fenótipos desejados, como capacidade de fermentação de carboidratos e

tolerância ao etanol. Dessa forma, visando à obtenção de leveduras para produção de cerveja, seria mais indicado o uso de mosto cervejeiro na etapa de enriquecimento.

3 I CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA

Para determinar as características bioquímicas das leveduras obtidas, frequentemente são empregados ensaios de caracterização, nos quais se avalia a capacidade das cepas crescerem quando expostas a diferentes condições químicas e físicas, e alterando a disponibilidade de micro- e macronutrientes. As principais caraterísticas avaliadas para leveduras aplicadas na produção de cerveja são: fermentação de carboidratos, tolerância ao lúpulo e tolerância ao etanol.

3.1 Fermentação de Carboidratos

Os carboidratos fermentescíveis presentes em maiores concentrações no mosto cervejeiro são: maltose (38 a 61 g/L), maltotriose (11 a 18 g/L), glicose (5 a 15 g/L), sacarose (1 a 6 g/L) e frutose (1 a 10 g/L) (MACWILLIAM, 1968). As concentrações exatas de cada carboidrato variam de acordo com o tipo de cerveja e a receita utilizada, especialmente, os tipos de maltes utilizados e as condições de mostura (tempo e temperatura das rampas). Os carboidratos são consumidos pelas leveduras de modo sequencial de acordo com a complexidade de sua estrutura, iniciando pela glicose e pela frutose, seguindo para a hidrólise da sacarose e por último a hidrólise da maltose e da maltotriose (LAGUNAS, 1993). Essa ordem de consumo dos carboidratos ocorre devido à repressão catabólica das vias metabólicas de carboidratos alternativos em favorecimento à utilização da glicose (LAGUNAS, 1993).

É importante determinar a capacidade de utilizar carboidratos presentes no mosto, visto que impacta diretamente nas características da cerveja produzida (CAPECE *et al.*, 2018). A fermentação parcial ou a ausência da fermentação de um ou mais carboidratos presentes no mosto pode acarretar produtos com sabores e aromas atípicos, reduzindo sua qualidade, por exemplo, a utilização lenta ou incompleta de maltotriose resulta em sabores adocicados (ZASTROW *et al.*, 2001).

A capacidade de utilização da maltose e da maltotriose também determina a concentração de etanol na cerveja. Quando a levedura não é capaz de consumir estes oligossacarídeos, como é o caso da maioria das cepas não-*Saccharomyces*, obtém-se cervejas com baixo teor alcóolico e com sabores adocicados. Neste caso, é uma alternativa simples para a produção de cerveja sem álcool em comparação ao processo com leveduras convencionais, no qual fermentação é conduzida em baixa temperatura ou as leveduras são removidas antes da formação de etanol (SANNINO *et al.*, 2019; BELLUT *et al.*, 2018). Nos últimos anos, visando obter cerveja com álcool e com aromas diferenciados, tem-se utilizado leveduras não-*Saccharomyces* junto com uma levedura *Saccharomyces*, que

produz etanol (SANNINO *et al.*, 2019; RAVASIO *et al.*, 2018).

A capacidade de metabolizar carboidratos é avaliada com metodologias que indiquem crescimento celular em meio líquido contendo um único carboidrato como fonte de carbono, através da visualização da acidificação do meio ou da medição da densidade óptica (DO). Kali *et al.* (2015), por exemplo, utilizaram uma microplaca de multipoços, sendo que cada poço continha meio líquido com diferentes carboidratos (Tabela 1). Os meios utilizados continham vermelho de fenol, cuja coloração é alterada quando o meio é acidificado pela fermentação do carboidrato presente, de modo que a detecção do crescimento é visual. O método empregado por Kali *et al.* (2015) não requer materiais ou equipamentos de alto custo, é de simples interpretação dos resultados, e o uso da microplaca é vantajoso por ser compacta e reduzir o volume de meio. Entretanto, o resultado não é quantitativo.

Fonte das leveduras	**Meio de cultivo**	**Carboidrato avaliado**	**Forma de incubação**	**Temperatura**	**Parâmetros medidos**
Banco de cepas[1]	Caldo vermelho fenol + 2 % carboidrato	Glicose	Microplaca Sem agitação Análise após 7 dias	25 a 30 ºC	Mudança da coloração por acidificação
		Sacarose			
		Lactose			
		Maltose			
Banco de cepas[2]	0,7 % YNB + Carboidrato	1 % Glicose	Microplaca Sem agitação Análise a cada 24 h por 4 dias	28 ºC	DO 600 nm
		1 % Frutose			
		2 % Sacarose			
		5,5 % Maltose			
		2 % Maltotriose			
		1 % Melibiose			
Banco de cepas de kombucha[3]	YT MicroPlate™ (BioLog)	Maltose	Microplaca Sem agitação Análise após 72 h	25 ºC	DO 590 nm
		Maltotriose			
		Glicose			
		Frutose			
		Sacarose			
		Melibiose			
		Raffinose			
		Celobiose			
Isoladas de destilarias de cachaça[4]	YP + 2 % carboidrato	Glicose	Frascos Agitação a 200 rpm Análise a cada 2 h por 72 h	30 ºC	DO 600 nm
		Maltose			
		Maltotriose			

Tabela 1 - Exemplos de metodologias de caracterização quanto à utilização de carboidratos.

Fonte: [1]Kali *et al.* (2015), [2]Methner *et al.* (2019), [3]Bellut *et al.* (2018), [4]Araújo *et al.* (2018).

A fim de obter dados quantitativos, pode ser medida a densidade óptica do meio, como feito por Methner *et al.* (2019), Bellut *et al.* (2018) e Araújo *et al.* (2018) (Tabela 1), no

entanto, é necessário espectrofotômetro ou leitor de microplaca. Dentre estes trabalhos, destaca-se a metodologia usada por Methner *et al*. (2019), devido aos cuidados realizados pelos autores: lavagem do inóculo para remover nutrientes residuais; padronização do inóculo por contagem celular; uso de controle negativo para cada meio testado; triplicata; incubação sem agitação para mimetizar as condições de fermentação do mosto, mas, com homogeneização imediatamente antes da medição da DO para suspender a biomassa; medição periódica da DO para construção de curva de crescimento; e uso de meio de cultivo no qual a única molécula orgânica em concentração significativa é o carboidrato testado.

A medição periódica de DO permite determinar a duração da fase lag e a velocidade de crescimento, e também foi feita por Araújo *et al*. (2018), que determinaram a velocidade específica de crescimento na fase exponencial para cada cepa. Por outro lado, como Methner *et al*. (2019) testaram 110 cepas, o resultado de DO foi apresentado de forma simplificada num mapa de calor, em que “houve crescimento” correspondia a DO maior que 0,4 e “não houve crescimento” a DO menor do que 0,4. Para uma cepa selecionada como exemplo por não utilizar maltose, Methner *et al*. (2019) mostraram a curva de crescimento para cada meio de cultivo testado. Em outra abordagem, Bellut *et al*. (2018) apenas avaliaram se a DO teve diferença em relação ao branco após a incubação.

As metodologias de Methner *et al*. (2019) e Araújo *et al.* (2018) também divergem quanto ao uso de agitação, à composição do meio e ao uso de cepas comerciais para comparação. A agitação não é recomendada, porque induz metabolismo aeróbico e, como algumas leveduras consomem maltotriose somente em aerobiose (ZASTROW *et al*., 2001), poderia resultar em falso positivo. Para contornar este problema, Araújo *et al*. (2018) adicionaram antimicina A, que é inibidor da respiração celular, ao meio com maltotriose.

Em relação à composição do meio, Methner *et al*. (2019) usaram o meio YNB (base nitrogenada para levedura), no qual as moléculas orgânicas estão em baixa concentração. Por outro lado, Araújo *et al*. (2018) usaram meio YP, composto de 1% extrato de levedura e 2% peptona, que também podem ser usados como fonte de carbono pelas leveduras, resultando em crescimento basal para todas as cepas. Devido à maior precisão do resultado, o uso do meio YNB é mais recomendado do que o meio YP para avaliação da utilização de carboidratos.

Por fim, Araújo *et al*. (2018) utilizaram 4 cepas comercialmente utilizadas na produção de cerveja para comparar os resultados obtidos com as cepas isoladas, permitindo avaliar a quão significativa era a velocidade específica de crescimento de cada cepa. Methner *et al*. (2019) não utilizaram cepas comerciais para comparação, fazendo apenas uma distinção entre crescimento ou não de cada cepa, mas, seria interessante se tivessem utilizado um controle para comparar a DO máxima e velocidade de crescimento das cepas isoladas com cepas comerciais.

3.2 Tolerância ao Lúpulo

O lúpulo confere amargor à cerveja e atua como antimicrobiano (ALMAGUER *et al.*, 2014; DELYSER; KASPER, 1994). A ação antimicrobiana do lúpulo é mais eficiente contra bactérias gram-positivas do que contra a maioria das bactérias gram-negativas, fungos filamentosos ou leveduras (EDWARDSON, 1952; OHSUGI *et al.*, 1997; SALLE *et al.*, 1949). As propriedades antimicrobianas do lúpulo são majoritariamente consequentes dos α-ácidos e dos β-ácidos (SRINIVASAN *et al.*, 2004). Os α-ácidos presentes são humolona, cohumolona, adhumolona, prehumulona e posthumulona, cujas formas isomerizadas (iso-α-ácidos) contribuem para o amargor da cerveja. Enquanto isso, os β-ácidos presentes são lupolona, colupulona, adlupolona, prelupolona e postlupulona (SRINIVASAN *et al.*, 2004). Os β-ácidos geralmente estão presentes em menor concentração no mosto do que os iso-α-ácidos devido à baixa solubilidade no mosto (SAKAMOTO, KONINGS, 2003) e pela preferência por lúpulo com menores teores de β-ácidos, uma vez que os β-ácidos são indesejados na cerveja porque seus produtos da oxidação apresentam características organolépticas desagradáveis (DE KEUKELEIRE, 2000). Portanto, apesar dos β-ácidos apresentarem atividade antimicrobiana maior do que os iso-α-ácidos (METHNER *et al.,* 2019), a análise do efeito do lúpulo na cerveja normalmente é baseada na concentração de iso-α-ácidos (BELLUT *et al.*, 2018).

A concentração de iso-α-ácidos é mensurada em *International Bitterness Units* (IBU), de modo que 1 IBU corresponde a 1 ppm de iso-α-ácidos (HUNTER; DOMPKOWSKI, 2018). A mensuração do IBU pode ser feita por HPLC, cromatografia de troca iônica, cromatografia líquida com detecção de absorbância ultravioleta ou com espectroscopia de massa, ou línguas eletrônicas, porém o método mais recomendado é a extração dos iso-α-ácidos com iso-octano, seguida pela determinação da absorbância em 275 nm (NASCIMENTO *et al*, 2021). Os valores de IBU divergem entre tipos de cerveja ou ainda dentro do mesmo tipo, devido a modificações nos ingredientes e nas receitas utilizados. Por exemplo, a Weisse varia de 3 a 6 IBU, a Lager estilo americana varia de 5 a 15 IBU, a Pale Ale estilo internacional varia de 20 a 42 IBU, e alguns tipos de cerveja podem chegar a 100 IBU (BREWERS ASSOCIATION, 2020).

A capacidade de uma cepa tolerar iso-α-ácidos é uma caracterização frequentemente realizada na seleção de cepas para produção de cerveja (Tabela 2). Methner *et al.* (2019) realizaram os testes de tolerância ao lúpulo simultaneamente ao teste de fermentação de carboidratos, utilizando microplacas e considerando como cepas tolerantes aquelas que apresentaram aumento de densidade óptica de pelo menos 0,4 após 4 dias de incubação. Nestes ensaios, utilizaram meio sintético composto por YNB e YCB (base carbono para levedura) enriquecido com extrato de lúpulo comercial isomerizado, para atingir 50 e 100 IBU de iso-α-ácidos, ou com extrato de lúpulo comercial rico em β-ácidos, para atingir 100 e 200 ppm de β-ácidos, avaliando a tolerância para iso-α-ácidos e para β-ácidos

separadamente e em mistura. A desvantagem do método de Methner *et al.* (2019) é a utilização de meio sintético ao invés de mosto cervejeiro, o que pode afetar o metabolismo do microrganismo e, portanto, o resultado obtido pode ser diferente do comportamento da levedura em mosto cervejeiro lupulado.

<table>
<tr><th>Fonte das leveduras</th><th>Meio de cultivo</th><th>Concentração de iso-α-ácidos (IBU) e β-ácidos (BA)</th><th>Forma de incubação</th><th>Temperatura</th><th>Parâmetros medidos</th></tr>
<tr><td rowspan="6">Banco de cepas[1]</td><td rowspan="6">0,7 % YNB + 2,33 % YCB + extrato de lúpulo</td><td>50 IBU</td><td rowspan="6">Microplaca
Sem agitação
Análise a cada 24 h por 4 dias</td><td rowspan="6">28 ºC</td><td rowspan="6">DO 600 nm</td></tr>
<tr><td>100 IBU</td></tr>
<tr><td>100 ppm BA</td></tr>
<tr><td>200 ppm BA</td></tr>
<tr><td>50 IBU + 100 ppm BA</td></tr>
<tr><td>100 IBU + 200 ppm BA</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Banco de cepas de kombucha[2]</td><td rowspan="3">Mosto cervejeiro + iso-α-ácidos</td><td>0 IBU</td><td rowspan="3">Frascos
Sem agitação
Análise a cada 40 min por 96 h</td><td rowspan="3">25 ºC</td><td rowspan="3">DO 600 nm</td></tr>
<tr><td>50 IBU</td></tr>
<tr><td>100 IBU</td></tr>
<tr><td>Banco de cepas[3]</td><td>Mosto cervejeiro lupulado + glicose</td><td>25 IBU</td><td>Frascos
Sem agitação
Análise após 2 semanas</td><td>22,3 ºC</td><td>Análise sensorial</td></tr>
</table>

Tabela 2 - Exemplos de metodologias de caracterização quanto à tolerância ao lúpulo.

Fonte: [1]Methner *et al.* (2019), [2]Bellut *et al.* (2018), [3]Osburn *et al.*, (2018).

Ao contrário de Methner *et al.* (2019), Bellut *et al.* (2018) e Osburn *et al.* (2018) utilizaram mosto cervejeiro como meio de cultivo. O mosto usado por Bellut *et al.* (2018) foi preparado dissolvendo extrato em pó de malte cervejeiro em água e enriquecendo com iso-α-ácidos, sem avaliar o efeito de β-ácidos (Tabela 2). Outra diferença é que Bellut *et al.* (2018) usaram frascos que apresentem menor área de troca gasosa por volume de meio do que as microplacas, portanto, simulando melhor as condições de fermentação industrial mesmo que dificultando a análise simultânea de muitas cepas.

Osburn *et al.* (2018) prepararam mosto cervejeiro por mosturação, com adição de lúpulo na etapa de fervura, e conduziram a fermentação em frascos com airlock (Tabela 2). Dessa forma, as cepas foram submetidas a condições mais próximas às condições de produção de cerveja artesanal do que nos métodos utilizados por Methner *et al.* (2019) e Bellut *et al.* (2018). A modificação da receita do mosto consistiu na adição de glicose ao mosto, provavelmente para favorecer o crescimento de cepas que não sejam capazes de utilizar maltose e maltotriose. A desvantagem da utilização de mostos cervejeiros é a variedade de tipos de mosto e de teores de IBU, de modo que o pesquisador precisa optar por um ou alguns tipos de mosto para testar.

A abordagem utilizada por Osburn *et al.* (2018) também se destaca das demais porque

avaliaram o aroma gerado, fazendo uma única etapa de seleção através da fermentação de mosto cervejeiro em menor escala (aproximadamente 400 mL), de modo que o crescimento foi determinado de forma indireta através da alteração do aroma. A vantagem deste método é que exclui cepas que não contribuem a um aroma interessante independente das demais características, como capacidade de fermentação de carboidratos. Através deste método, os autores conseguiram selecionar leveduras com potencial para produção de diferentes aromas ao mesmo tempo que avaliaram a tolerância ao lúpulo, num único ensaio.

Os resultados de Methner *et al.* (2019) e Bellut *et al*. (2018) indicam que a maioria das leveduras não são inibidas pelas concentrações de ácidos de lúpulo testadas, por exemplo, dentre as 110 cepas avaliadas por Methner *et al.* (2019), somente três cepas não cresceram em 200 ppm de β-ácidos e somente uma cepa foi inibida por 100 IBU. Dentre as cepas testadas por Bellut *et al*. (2018), todas apresentaram aumento da DO de pelo menos 0,6 e algumas cepas cresceram mais rápido do que a cepa comercial usada como controle, no entanto, nenhuma cepa atingiu o valor de DO final do controle provavelmente por não serem capazes de metabolizar todos os carboidratos do mosto. Methner *et al*. (2019) observaram que as leveduras possuem uma maior resistência para os compostos iso-α-ácidos do que em relação com os β-ácidos e que as misturas de iso-α-ácidos com β-ácidos resultam em maior inibição, que indica que as propriedades antimicrobianas desses compostos podem agir de modo acumulativo sobre os microrganismos presentes.

Os valores testados por Methner *et al*. (2019) e por Bellut *et al*. (2018) são maiores do que as concentrações presentes na grande maioria dos mostos cervejeiros utilizados comercialmente, mas, existem tipos de cerveja com valores elevados de até 100 IBU (BREWERS ASSOCIATION, 2020).

3.3 Tolerância ao Etanol

O etanol é um estressante ambiental para leveduras, de modo que, quanto maior a concentração de etanol, maior será a fluidez da membrana plasmática, gradualmente prejudicando sua integridade estrutural, reduzindo a velocidade de crescimento e podendo levar à morte celular (DING *et al*., 2009). As leveduras possuem diferentes estratégias para contornar o efeito negativo do etanol, como a inserção de compostos na membrana plasmática para aumentar a estabilidade, a expressão de fatores capazes de estabilizar ou reparar as proteínas prejudicadas pelo etanol e a expressão de outros genes relacionados à tolerância a diferentes tipos de stress (YOU *et al*., 2003; MACPHERSON *et al*., 2006; BETZ *et al*., 2004; SWAN, WATSON, 1998; VIANNA *et al.*, 2007).

Cepas utilizadas comercialmente apresentam maior eficiência de produção de etanol e tolerância a etanol do que as cepas não-convencionais (CAPECE *et al*., 2018). O uso de espécies não-convencionais pode ser feito junto com cepas comerciais, em cofermentação ou em fermentação sequencial. Tal processo pode resultar em cervejas com características aromáticas e gustativas diferenciadas como consequência do uso de

espécies não-convencionais, enquanto a concentração alcoólica permanece em níveis adequados devido à fermentação por cepas convencionais (CANONICO *et al.*, 2016; RAVASIO *et al.*, 2018). No caso da cofermentação, a cepa não-convencional estará sujeita a concentrações crescentes de etanol ao longo da fermentação, por isso, é importante caracterizar a tolerância ao etanol (MUKHERJEE *et al.*, 2017). Grijalva-Vallejos *et al.*, (2020) ressaltam que diferentes cepas da mesma espécie podem apresentar resultados bastante contrastantes de tolerância a etanol e outras condições ambientais, logo, é importante a realização da caracterização, independente da classificação filogenética.

A seleção de leveduras com tolerância a etanol pode ser realizada através da adição de etanol ao meio durante as etapas de isolamento ou caracterização (CUBILLOS *et al.*, 2019). Semelhante ao ensaio de tolerância ao lúpulo, Methner *et al.* (2019) avaliaram a tolerância ao etanol utilizando meio composto por YNB e YCB enriquecidos com diferentes concentrações de etanol considerando como cepas tolerantes aquelas que apresentaram aumento de densidade óptica de pelo menos 0,4 após 4 dias de incubação (Tabela 3). Novamente, a desvantagem deste procedimento está no uso do meio sintético ao invés do mosto cervejeiro, uma vez que os componentes do mosto podem influenciar positivamente ou negativamente a tolerância ao etanol.

<table>
<tr><th>Fonte das leveduras</th><th>Meio de cultivo</th><th>Concentração de etanol (v/v)</th><th>Forma de incubação</th><th>Temperatura</th><th>Parâmetros medidos</th></tr>
<tr><td rowspan="5">Banco de cepas[1]</td><td rowspan="5">0,7 % YNB + 2,33 % YCB + Etanol</td><td>1 %</td><td rowspan="5">Microplaca
Sem agitação
Análise a cada 24 h por 4 dias</td><td rowspan="5">28 ºC</td><td rowspan="5">DO 600 nm</td></tr>
<tr><td>2 %</td></tr>
<tr><td>5 %</td></tr>
<tr><td>8 %</td></tr>
<tr><td>10 %</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Banco de cepas de vinho[2]</td><td rowspan="4">YPD + Etanol</td><td>0 %</td><td rowspan="4">Tubos de ensaio
Sem agitação</td><td rowspan="4">22 ou 37 ºC</td><td rowspan="4">DO 595 nm ou formação de gás</td></tr>
<tr><td>10 %</td></tr>
<tr><td>15 %</td></tr>
<tr><td>18 %</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Fermentação espontânea de chicha[3]</td><td rowspan="4">GPY + Etanol</td><td>2 %</td><td rowspan="4">Placas de petri
Análise a cada 24 h por 3 dias</td><td rowspan="4">30 ºC</td><td rowspan="4">Formação de colônias</td></tr>
<tr><td>5 %</td></tr>
<tr><td>10 %</td></tr>
<tr><td>12 %*</td></tr>
</table>

Tabela 3 - Exemplos de metodologias de caracterização quanto à tolerância ao etanol.

Fonte: [1]Methner *et al.* (2019), [2]Benítez *et al.* (1983), [3]Grijalva-Vallejos *et al.* (2020).

Meios sintéticos também foram utilizados por Benitez *et al.* (1983) e por Grijalva-Vallejos *et al.*, (2020). Grijalva-Vallejos *et al.*, (2020) compararam o crescimento das cepas isoladas das chichas com o crescimento de cepas comerciais usando o meio GPY (4 % glicose, 0,5 % peptona e 0,5 % extrato de levedura) enriquecido etanol em placas

Petri. Benitez *et al.* (1983) visavam a caracterização de leveduras *Saccharomyces* para a produção de vinho e utilizaram YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose) enriquecido com concentrações maiores de etanol, conduzindo os ensaios em duas temperaturas (Tabela 3).

O principal diferencial do trabalho de Benitez *et al.* (1983) foi na análise dos resultados: para cada ensaio, calcularam o tempo de duplicação a partir da densidade óptica medida, caracterizando o crescimento; além disso, separadamente, avaliaram a liberação de gás com tubo de Durham, caracterizando a capacidade fermentativa. Dessa forma, demonstraram que a capacidade fermentativa não está relacionada ao crescimento, uma vez que a influência do etanol foi maior no crescimento do que na capacidade fermentativa. Inclusive, algumas cepas apresentaram alta capacidade fermentativa em condições em que não apresentaram crescimento celular (Benitez *et al.,* 1983), o que sugere que a medida da liberação de CO_2 pode ser um parâmetro mais útil do que a densidade óptica comumente utilizada.

As concentrações de etanol testadas por Methner *et al*. (2019) e Grijalva-Vallejos *et al*., (2020) incluem os valores comumente encontrados na cerveja, entre 2 e 6% (WOOD, 1998), mas também incluem concentrações de até 10 %, que são menos comuns. Methner *et al*. (2019) destacam que houve uma redução no número de cepas tolerantes conforme a concentração de etanol aumenta: dentre as 110 cepas testadas somente 1 cepa não tolerou 5 % de etanol, enquanto aproximadamente 25 % não toleraram 8 %. Os resultados obtidos evidenciam que o aumento da concentração de etanol resulta na desaceleração do crescimento das leveduras, havendo um limite que, uma vez ultrapassado, pode impedir por completo o crescimento das cepas presentes na solução. Portanto, o uso de concentrações elevadas de etanol, como feito por Benitez *et al.* (1983), que utilizaram apenas concentrações acima de 10 %, é indicado somente se é desejável obter cepas que serão submetidas a estas condições, uma vez que tende a reduzir a variedade e quantidade de cepas selecionadas.

Benitez *et al.* (1983) também observou que as cepas utilizadas apresentaram uma maior tolerância ao etanol em temperaturas menores, apresentando crescimento até a concentração de 18 % a 22 ºC, enquanto o crescimento parava completamente na concentração de 15 % a 37 ºC. Este resultado é esperado uma vez que o aumento da temperatura também causa o aumento da fluidez da membrana, de modo que o acúmulo de estressores ambientais acarreta um número reduzido de cepas selecionadas. Por um lado, é importante que sejam avaliados os efeitos dos fatores limitantes para o crescimento das leveduras em conjunto, mas, por outro lado, deve-se mimetizar as condições da produção da cerveja. Portanto, é interessante que o ensaio de tolerância ao etanol seja realizado em mosto cervejeiro contendo lúpulo, mas, em temperaturas menores do que as utilizadas por Methner *et al*. (2019) e Grijalva-Vallejos *et al*., (2020), e mais próximas das temperaturas comumente utilizadas. É possível que a porcentagem das cepas avaliadas por Methner *et*

al. (2019) e Grijalva-Vallejos *et al.*, (2020) que toleram etanol a 8% e 10 % fosse maior se os experimentos tivessem sido realizados a 20 °C, por exemplo.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a produção de cerveja, a escolha de cepas que melhor se adequem à receita escolhida e, assim, apresente as características desejadas é uma etapa crucial para que a cerveja produzida expresse a qualidade almejada atendendo às expectativas tanto do produtor quanto do consumidor. A escolha dos métodos de seleção e caracterização a serem empregados deve ser cuidadosamente realizada, tendo em mente os principais critérios para que as cepas escolhidas sejam adequadas para a produção da cerveja de interesse, tolerando os estressores presentes durante o processo de produção e sendo capazes de produzir aromas e sabores adequados ao tipo de cerveja.

Outros critérios importantes na escolha da metodologia são o número de cepas a serem avaliadas e as limitações técnicas e orçamentárias. Existe uma grande gama de métodos que podem ser empregados de modo individual ou complementar, dependendo do tipo de produto que se deseja obter e dos recursos disponíveis. Ao aplicar estes métodos, recomenda-se usar temperatura de incubação próxima à temperatura de processo e incluir metodologias que avaliem os aromas e os sabores gerados.

Por conta da diversidade de tipos de cerveja, nenhum dos critérios de caracterização analisados no presente artigo deve ser considerado como excludente na seleção da cepa quando não é definido um tipo específico de cerveja a ser produzida. Por exemplo, cepas que utilizam maltose e maltotriose podem ser usadas para produção de cerveja sem álcool ou para agregar aromas em cerveja com álcool em cofermentação ou fermentação sequencial. Leveduras com baixa tolerância ao lúpulo são raras, mas, ainda poderiam ser usadas para produzir cervejas com baixo valor de IBU. Portanto, é importante definir o tipo de cerveja que se almeja produzir para definir as metodologias a serem empregadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e. Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Tecnológica concedida à Marcela Moreira Albuquerque.

REFERÊNCIAS

ALMAGUER, C. *et al*. Humulus lupulus–a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014.

ARAÚJO, T. M. *et al*. Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 10, p.1749-1766, 2018.

BARRY, J. *et al*. Two Novel Strains of Torulaspora delbrueckii Isolated from the Honey Bee Microbiome and Their Use in Honey Fermentation. **Fermentation**, v.22, p.1-11, 2018.

BASSO, R. F. *et al*. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, v. 86, p. 112-120, 2016.

BELLUT, K. *et al*. Lachancea fermentati strains isolated from kombucha: fundamental insights, and practical application in low alcohol beer brewing. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 764, 2020.

BELLUT, K. *et al*. Application of non-Saccharomyces yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 66, 2018.

BENÍTEZ T. *et al*. Selection of Wine Yeasts for Growth and Fermentation in the Presence of Ethanol and Sucrose. **Applied And Environmental Microbiology**, v.45, p.1429-1436, 1983.

BETZ, C. *et al*. Asr1p, a Novel Yeast Ring/PHD Finger Protein, Signals Alcohol Stress to the Nucleus. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p.28174-28181, 2004.

BREWERS ASSOCIATION, 2020 Brewers Association Beer Style Guidelines. 2020. Disponível em: https://www.brewersassociation.org/edu/brewers-association-beer-style-guidelines/. Acesso em: 25 out. 2020.

CANONICO, L. *et al*. Torulaspora delbrueckii in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. **Food microbiology**, v. 56, p. 45-51, 2016.

CAPECE, A. *et al.* Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. Fermentation, **Potenza**, v.4, p.38-48, 2018.

CHEN, Y. Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 581-597, 2011.

CUBILLOS, F. A. *et al*. Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. **Yeast**, v. 36, n. 6, p. 383-398, 2019.

DE KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Quimica nova**, v. 23, p. 108-112, 2000.

DELYSER, D.Y.; KASPER, W.J. Hopped Beer: the case for cultivation. **Economic Botany**, v.48, n.2, p. 166-170, 1994.

DING, J. *et al.* Tolerance and stress response to ethanol in the yeast Saccharomyces cerevisiae. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v.85, n. 2, p. 253-263, 2009.

DURELLO, R. *et al*.Química do Lúpulo. **Química Nova**, v.42, p.900-919, 2019.

EDWARDSON, J.R. Hops: their botany, history, production and utilization. **Economic Botany**, v.6, n.2, p.160-175, 1952.

ESTELA-ESCALANTE, W. D. *et al*. Evaluation of the fermentative potential of Candida zemplinina yeasts for craft beer fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 3, p. 530-535, 2016.

GRIJALVA-VALLEJOS, N. *et al*. Evaluation of yeasts from Ecuadorian chicha by their performance as starters for alcoholic fermentations in the food industry. **International journal of food microbiology**, v. 317, p. 108462, 2020.

GUTIÉRREZ, A. *et al*. Evaluation of non-Saccharomyces yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 4, p. 389-402, 2018.

HOLT, S. *et al*. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55-66, 2018.

HUNTER, Rebecca A.; DOMPKOWSKI, Eric J. Quantifying Beer Bitterness: An Investigation of the Impact of Sample Preparation. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 11, p. 2009-2012, 2018

KALI, A. *et al*. A cost-effective carbohydrate fermentation test for yeast using microtitre plate. **Indian Journal Of Medical Microbiology**, v.33, p.293-295, 2015.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews,** v.10, p. 229-242, 1993.

LAITILA, A. *et al*. Indigenous microbial community of barley greatly influences grain germination and malt quality. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 1, p. 9-20, 2007.

MACPHERSON, S. *et al*. A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the zinc cluster proteins. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 3, p. 583-604, 2006.

MACWILLIAM, I. C. Wort composition—A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 74, n. 1, p. 38-54, 1968.

METHNER, Y. *et al*. Screening for the brewing ability of different non-Saccharomyces yeasts. ***Fermentation***, v.*5, n.*4, p.101, 2019.

MICHEL, M. *et al*. Screening for new brewing yeasts in the non-Saccharomyces sector with Torulaspora delbrueckii as model. **Yeast**, v. 33, n. 4, p. 129-144, 2016.

MUKHERJEE, V. *et al*. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. **Biotechnology For Biofuels**, v.10, n.1, p. 1-19, 2017.

NASCIMENTO, I. *et al*. Dynamic Evolution of Bitterness Units in Beer Worts: Modeling and Concerns. **American Academic Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences**, v. 80, n. 1, p. 145-155, 2021.

OHSUGI, M. *et al* Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from Humulus lupulus against Helicobacter pylori. **Journal Of Traditional Medicines**, v.14, p.186-191, 1997.

OSBURN, K. *et al*. Bio-prospecting, selection, and analysis of wild yeasts for ethanol fermentation. **Zymurgy**, v.39, p.81-88, 2016.

OSBURN, K. *et al*. Primary souring: a novel bacteria-free method for sour beer production. **Food Microbiology**, v. 70, p. 76-84, 2018.

RAVASIO, D. *et al*. Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. **Fermentation,** v. 4, n.1, p.15, 2018.

ROSSO, L. *et al*. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 2, p. 610-616, 1995.

RUSSELL, J. B.; DIEZ-GONZALEZ, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Advances in microbial physiology**, v. 39, p. 205-234, 1997.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v.*89, n.*2, p.105–124, 2003.

SALLE, AJ. *et al*. Lupulon--An Antibiotic Extracted from the Strobiles of Humulus lupulus. **Experimental Biology And Medicine**, v. 70, p. 409-411, 1949.

SANNINO, C. *et al*. Non-conventional Yeasts for producing alternative beers. In: **Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application**, p. 361-388, 2019.

SIBIRNY, A. A.; SCHEFFERS, L. Thematic section "Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Ecology of Non-conventional Yeasts". **FEMS Yeast Res**, v. 2, n. 293, p. 1567-1364.2002.

SNIEGOWSKI, P. D. *et al*. Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces paradoxus coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. **FEMS yeast research**, v. 1, n. 4, p. 299-306, 2002.

SRINIVASAN, V. *et al*. Contributions to the Antimicrobial Spectrum of Hop Constituents. **Economic Botany**, v.58, p.230-238, 2004.

SWAN, T. M.; WATSON, K. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **Fems Microbiology Letters**, v. 169, p.191-197, 1998.

VIANNA, C.R.; SILVA, C. Saccharomyces cerevisiae strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.93, p. 205-217, 2007.

WOOD, B. J. **Microbiology of Fermented Foods.** 2 edição. Thomas Science, 1998.

YOU, K. M. *et al*. Ethanol Tolerance in the Yeast Saccharomyces cerevisiae Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. **Applied And Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1499-1503, 2003.

ZASTROW, C. R. *et al*. Maltotriose fermentation by Saccharomyces cerevisiae. Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology, v.27, n.1, p.34-38, 2001.

CAPÍTULO 6

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Cunninghamella elegans* UCP 542 E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE APÓS EXPOSIÇÃO A CONDIÇÕES EXTREMAS

Data de aceite: 01/02/2022

Camilla Pereira de Arruda
Escola de Saúde e Ciências da vida,
Universidade Católica de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil
http://lattes.cnpq.br/2386564510843270

Evelyn Tamires Nascimento Andrade
Escola de Saúde e Ciências da vida,
Universidade Católica de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil
http://lattes.cnpq.br/6638279308302904

Luanna Julia Silva de Melo
Escola de Saúde e Ciências da vida,
Universidade Católica de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil
http://lattes.cnpq.br/9527710145261512

Emerson Ryan Neves de Souza
Escola de Saúde e Ciências da vida,
Universidade Católica de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil
http://lattes.cnpq.br/0349063286484281

Eduardo Henrique Cabral Braga
Escola de Saúde e Ciências da vida,
Universidade Católica de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil
http://lattes.cnpq.br/6148442507411711

Vitória Régia da Silva
Escola de Saúde e Ciências da vida,
Universidade Católica de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil
http://lattes.cnpq.br/0020497984997800

Carlos Henrique Corrêa Xavier
Escola de Saúde e Ciências da vida,
Universidade Católica de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil
http://lattes.cnpq.br/7559656512909265

Galba Maria de Campos Takaki
Escola de Saúde e Ciências da vida,
Universidade Católica de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil
http://lattes.cnpq.br/0974509229906743

Luiz Oliveira da Costa Filho
Escola de Saúde e Ciências da vida,
Universidade Católica de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil
http://lattes.cnpq.br/2983953041006730

Rosileide Fontenele da Silva Andrade
Escola de Saúde e Ciências da vida,
Universidade Católica de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil
http://lattes.cnpq.br/6306166869610699

RESUMO: Os biossurfactantes são compostos anfipáticos produzidos por micro-organismos com várias e importantes aplicações industriais e ambientais, cujos metabólitos vem sendo investigado pelas vantagens de produção a partir de fontes renováveis e funcionalidade sob condições extremas. Deste modo, neste trabalho foi investigada a utilização de meio alternativo constituído por fontes renováveis para produção do biossurfactante por *Cunninghamella elegans.* A produção do biossurfactante foi investigada no meio alternativo formulado com resíduo de macarrão instantâneo (2%), óleo pós fritura

(0,5%) e milhocina (2%). Após 96h de cultivo foi avaliada no líquido metabólico a tensão superficial, a capacidade de formação de emulsões e o potencial de manter a estabilidade tensoativa após exposição térmica, iônica e do pH. Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72mN/m para 33,6mN/m e produzir 96,42% de emulsificação utilizando o óleo motor e 69,23% com óleo queimado de motor. O biossurfactante demonstrou estabilidade da tensão superficial em valores extremos de concentrações de sal (20% de NaCl), em pH ácido, neutro e alcalino e em diferentes temperaturas, indicando seu potencial de uso em aplicações industriais. Neste contexto, o biossurfactante produzido possui potencial promissor de competir com os surfactantes quimicamente sintetizados promovendo o estímulo do mercado nacional e mundial na utilização de produtos menos tóxicos, biodegradáveis e ecologicamente corretos.
PALAVRAS-CHAVE: Tensoativo, Fungos, Resíduos, Tensão superficial, Sustentabilidade.

PRODUCTION OF BIOSSURFACTANT BY *Cunninghamella elegans* UCP 542 AND EVALUATION OF STABILITY AFTER EXPOSURE THE EXTREME CONDITIONS

ABSTRACT: Biosurfactants are amphipathic compounds produced by microorganisms with several important industrial and environmental applications, whose metabolites has been investigated by advantages of production from renewable sources and functionality under extreme conditions. Thus, in this work, the use of alternative medium consisting of renewable sources for the production of the biosurfactant by Cunninghamella elegans was investigated. The production of the biosurfactant was investigated in alternative medium formulated with instant noodle residue (2%), post-frying oil (0.5%) and corn steep liquor (2%). After 96h of cultivation, the surface tension, capacity of form emulsions and the potential to maintain surface-active stability after thermal, ionic and pH exposure were evaluated in the metabolic liquid. The results obtained showed that the biosurfactant was able of reduce the surface tension of water of 72mN/m to 33.6mN/m and produce 96.42% of emulsification using motor oil and 69.23% using burnt motor oil. The biosurfactant demonstrated surface tension stability at extreme values of salt concentrations (20% NaCl), in acidic, neutral and alkaline pH and in different temperatures, indicating its potential for use in industrial applications. In this context, the biosurfactant produced has promising potential for compete with chemically synthesized surfactants, stimulating the national and world market by use of products which are least toxic, biodegradable and ecologically correct.
KEYWORDS: Surfactant, Fungi, Waste, Surface tension, Sustainability.

1 | INTRODUÇÃO

Os surfactantes, também conhecidos como tensoativos, são compostos químicos derivados do petróleo. Estruturalmente, possuem caráter anfifílico, com uma região hidrofílica e região hidrofóbica na mesma molécula, o que confere potencial de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos imiscíveis (NITSCHKE e PASTORE, 2002; GROSSO-BECERRA, et al., 2016; DAS et al., 2021; MARTINS, et al.2021; SANTIAGO et al., 2021).

Consumidores de diversas partes do mundo passam a ter uma consciência ambiental mais ativa, tendo ciência dos efeitos nocivos de surfactantes químicos, tanto para a saúde, como maior toxicidade e riscos quando os produtos formulados com surfactantes químicos são lançados, após uso, no meio ambiente (BANAT et al., 2021).

Os biossurfactantes são surfactantes naturais que podem ser produzidos por micro-organismos. Por ser de origem natural, esses compostos possuem diversas vantagens quando comparados aos surfactantes químicos, em especial a baixa toxicidade, fácil biodegradabilidade e estabilidade em amplas faixas de pH, temperatura, e em diferentes concentrações salinas (HMIDET et al., 2019; ROCHA E SILVA et al., 2019).

A funcionalidade dos biossurfactantes em condições extremas de temperatura, pH e salinidade é importante por possibilitar diversas aplicações biotecnológicas, tais como, a biorremediação, a compostagem de solo, em processo medicinal e farmacêutico, na indústria de produtos de higiene e cosmética, entre outros. Portanto, os biossurfactantes são considerados os melhores candidatos para uso em formulações de bioprodutos a serem utilizados nos diversos setores industriais (ALI FERDAUSI et al., 2021).

A produção dos biossurfactantes ainda não é competitiva com os surfactantes químicos devido ao elevado custo de produção associado à baixa produtividade e ao uso de substratos onerosos (OSMAN et al., 2019; SAŁEK; EUSTON, 2019; BANAT et al., 2021).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo produzir biossurfactante por *Cunninghamella elegans* a partir de matéria-prima renovável e avaliar a estabilidade do sob condições ambientais extremas.

2 I MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

O fungo utilizado foi a *Cunninghamella elegans* UCP 542 que encontra-se mantida em meio ágar sabouraud a 5ºC, no Banco de Culturas no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco (NPCIAMB - UNICAP), Brasil, registrado na World Federation for Culture Collection (WFCC).

2.2 Matéria-prima renovável

A matéria prima de origem renovável utilizada para produção do biossurfactante foi o resíduo de macarrão instantâneo (gentilmente cedido pela indústria local), a milhocina (obtida da indústria de processamento de milho Corn Products Brasil localizada no município de Cabo de Santo Agostinho/PE) e o óleo de soja pós fritura (disponibilizado pelo comércio informal da região).

2.3 Inóculo

Para preparo do inóculo, *Cunninghamella elegans* foi crescida em meio ágar

sabouraud (peptona 10 $g.L^{-1}$, dextrose 40 $g.L^{-1}$, ágar 18 $g.L^{-1}$). Em seguida, os esporos foram transferidos para a água estéril até a obtenção de 10^7 esporos/mL. Posteriormente, 5% da solução espórica foi inoculada no meio de produção do biossurfactante.

2.4 Produção do biossurfactante

A produção do biossurfactante foi investigada no meio de produção formulado com resíduo de macarrão instantâneo (2%), óleo pós fritura (0,5%) e milhocina (2%) de acordo com Andrade et al (2018). Os frascos de Erlenmeyer contendo o meio de produção e suspensão espórica foram mantidos em agitação orbital 150 rpm, pelo período de 96 horas, à temperatura de 28ºC. Após o cultivo, foi realizada a filtração (membrana de nylon silkscreen 120F) com a finalidade de separar o liquido metabólico da biomassa.

2.5 Determinação da tensão superficial (TS)

A tensão superficial foi medida no liquido metabólico utilizando tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltd., Finland) e força registrada pelo utilizando anel de DU NUOY de acordo com a metodologia de Kuykina et al., (2001).

2.6 Determinação do índice de emulsificação (IE_{24}%)

Para identificação do biossurfactante em formar emulsões estáveis foi determinado o Índice de Emulsificação com leitura após 24h seguindo a metodologia de Cooper e Goldenberg (1986). Como substrato hidrofóbico foi utilizado óleo de motor queimado (OMQ) e Óleo de Motor (OM) na proporção 1:1. O cálculo do índice de emulsificação foi realizado de acordo com a seguinte equação:

Altura da emulsão (AE) / Altura total (AT) x 100 (Eq. 1)

2.7 Estabilidade do biossurfactante avaliada pela tensão superficial

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada de acordo com a determinação da tensão superficial do líquido metabólico submetido a diferentes pHs (2,4,6,8,10 e 12), diferentes concentrações de NaCl (2%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% e 20%) e diferentes temperaturas (0ºC, 5ºC, 70ºC, 100ºC e 120ºC), por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram lidas em tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltd., Finland) de acordo com a metodologia de Kuykina et al., (2001).

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de biossurfactante por *Cunninghamella elegans* utilizando resíduos industriais

No sentido de agregar valor aos resíduos industriais e minimizar os impactos ambientais causados ao meio ambiente, foi investigada a produção de biossurfactante por

Cunninghamella elegans utilizando como meio de cultivo resíduos de origem alimentícia. Neste contexto, *C. elegans* demonstrou ser micro-organismo com potencial promissor para produzir biossurfactante em meio alternativo constituído por resíduos industriais (resíduo de macarrão instantâneo 2%, milhocina 2% e óleo de soja pós fritura 0,5%) reduzindo a tensão superficial de 72 mN/m para 33,6 mN/m.

A Tabela 1 mostra a eficiência do biossurfactante de *C. elegans* na redução da tensão superficial comparado a surfactante químico e outros biossurfactantes produzidos por fungos. De acordo com os resultados, o biossurfactante produzido a partir do presente estudo demonstra propriedades tensoativas semelhantes a dos surfactantes químicos, com o diferencial de ser uma biomolécula natural que não causa danos severos aos seres humanos e ao meio ambiente.

Natureza do Biossurfactante	Resíduo	Microrganismo	Tensão superficial (mN/m)	Referências
Biológico	Resíduo de macarrão instantâneo, óleo pós fritura e Milhocina	*C. elegans*	33,6	Neste estudo
Surfactante Sintético	Químico	Dodecil sulfato de sódio-SDS	37.0	Christoli and ivshina (2002)
Biológico	Casca de jatobá e milhocina	*Mucor circinelloides*	34,00	Santiago et al. (2021)
Biológico	óleo de soja	*Pleurotus ostreatus*	40,7	Alves et al. (2017)
Biológico	Resíduo de soja	*C.echinulata*	36.0	Andrade Silva et al. (2014)

Tabela 1- Resultado da produção de biossurfactante por *Cunninghamella elegans* em comparação com a literatura.

3.2 Potencial do biossurfactante como agente emulsificante

Os biossurfactantes apresentam capacidade de formar emulsões estáveis (NITSCHKE e PASTORE 2002). Neste contexto, após 24 horas observou-se que o biossurfactante de *C. elegans* foi capaz de formar emulsões com excelente índice de emulsificação IE24 (96,42%) utilizando como substrato hidrofóbico o óleo motor e significativo resultado foi obtido usando o óleo queimado de motor (69,23%).

Os resultados obtidos demonstram que o biossurfactante produzido por *C. elegans*, em meio alternativo constituído por resíduos, apresenta significativas propriedades emulsificantes, uma vez que Willumsen e Karlson (1997) consideram valores significativos acima de 50% de emulsificação. A partir dos resultados obtidos é possível comprovar que o emprego da biotecnologia aliada ao uso do fungo *C. elegans* permitiu a conversão de

resíduos industriais para obtenção de biossurfactante como um bioproduto de alto valor agregado para indústrias.

3.3 Estabilidade da tensão superficial após exposição do biossurfactante de *C. elegans* a condições extremas

Um dos fatores que contribui para que os biossurfactante se tornem competitivos com os surfactantes químicos é que estes compostos apresentem estabilidade e manutenção de suas propriedades em condições extremas de temperatura, pH e salinidade. A estabilidade frente a essas condições direciona seu potencial de aplicação industrial (BARROS et al., 2008). Neste contexto, no presente trabalho foi avaliado no liquido metabólico a estabilidade do biossurfactante produzido por *C. elegans* após exposição a diferentes pHs, concentrações de NaCl e temperaturas. A medição da estabilidade foi avaliada pela tensão superficial.

O biossurfactante de *C. elegans* mostrou estabilidade iônica em todas as concentrações testadas (tensão superficial na faixa entre 34-36mN/m) obtendo máxima concentração de 20% de NaCl (Figura 1A). Em relação à influência do pH sobre a tensão superficial do líquido metabólico contendo o biossurfactante (Figura 1B), observou-se que o biossurfactante manteve estável o valor da tensão superficial (tensão superficial na faixa entre 33- 38mN/m) em pH ácido, neutro e alcalino. A ocorrência de valores estáveis de tensão superficial também foi observado em todas as faixas de temperaturas testadas (tensão superficial na faixa 34-38mN/m)(Figura 1). A partir dos resultados obtidos é possível identificar que independente da alteração do pH, temperatura e concentração de NaCl utilizada, o biossurfactante permaneceu eficiente na redução da tensão superficial, o que indica seu potencial de aplicação em diferentes setores industriais.
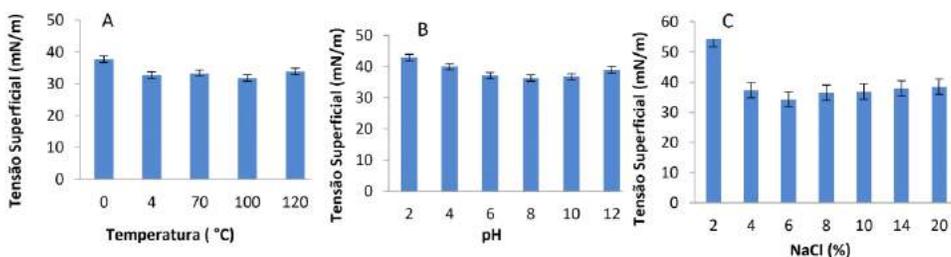
Figura 1- Estabilidade do biossurfacatante de *C. elegans* avaliado pela tensão superficial: (A) diferentes temperaturas, (B) diferentes pH e (C) diferentes concentrações de NaCl

4 I CONCLUSÃO

O biossurfactante produzido por *Cunninghamella elegans* em meio alternativo contendo resíduos industriais foi efetivo na redução da tensão superficial, na formação de emulsões estáveis e foi estável após exposição térmica, iônica e as mudanças no pH.

Portanto, o referido biossurfactante possui propriedades superiores à dos surfactantes químicos, atende aos padrões da sustentabilidade e possui potencial de uso como matéria-prima de diversos produtos industriais.

REFERÊNCIAS

ALI FERDAUSI, DAS SHARUP, HOSSAIN TANIM JABID, CHOWDHURY SUMAIYA ISLAM, ZEDNY SUBRINA AKTER, DAS TUHIN, AHMED CHOWDHURY MOHAMMAD NAZMUL E UDDIN MOHAMMAD SERAJ 2021 **otimização da produção, estabilidade e potencial de emulsificação de óleo de biossurfactantes de bactérias selecionadas isoladas de locais contaminados com óleo r. soc. abrir** sci. 8 211003 211003 disponível em: http://doi.org/10.1098/rsos.211003

ANDRADE, R. F. S.; RODRIGUEZ, D. M.; RIBEIRO, D. L.; LIMA, R.A.; ARAÚJO, H.W.C.; PESSOA, A.; TAKAKI, G.M.C. **Production of surface active agent and biodegradation fuel by acclimated Rhodotorula glutinis UCP/WFCC 1555 on diesel oil. In: A. Méndez-Vilas. (Org.). "Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: current status and trends"**. 14ed.:WageningenAcademicPublishers, 2014, p. 205-210, 2014

Barros, Francisco Fábio Cavalcante, Quadros, Cedenir Pereira de e Pastore, Gláucia Maria **Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por Bacillus subtilis em manipueira. Food Science and Technology** [online]. 2008, v. 28, n. 4 [Acessado 2 Dezembro 2021] , pp. 979-985. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000400034>.

Barros, F. F. C; Quadros, C. P; Pastore, G. M. **Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por Bacillus subtilis em manipueira**. Ciênc. Tecnol. Aliment. 28(4): 979-985,

BANAT, I. M.; CARBOUÉ, Q.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; CÁZARES-MARINERO, J.J. **Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. Bioresource Technology**, v. 320, n. October 2020, 2021.

DAS A.J. , AMBUST S. , SINGH T. , KUMAR R. **Tratamentos de projeto assistido por biossurfactante para remediação de solo contaminado com petróleo e estudo interativo baseado em metabolômica com Brassica nigra L**. Environ. Chall. , v. 4 (2021) , pp. 01-04.

GAUR V.K. , TRIPATHI V . , GUPTA P. , DHIMAN N. , REGAR R.K. , GAUTAM K. , SRIVASTAVA J.K. , PATNAIK S. , PATEL D.K. , MANICKAM N. **rhamnolipids e *planococcus spp.* e seu mecanismo de ação contra bactérias patogênicas. bioresour. technol.** , v 307 (2020), 10.1016 / j.biortech.2020.123206

GROSSO-BECERRA M.-V., GONZÁLEZ-VALDEZ A., GRANADOS-MARTÍNEZ M. MORALES E. , SERVÍN-GONZÁLEZ L. , MÉNDEZ J.-L. , DELGADO G. , MORALE SPINOSA R. , PONCE-SOTO G.-Y., COCOTL-YAÑEZ M. ***pseudomonas aeruginosa* atcc 9027 é uma cepa não virulenta adequada para a produção de mono-ramnolipídios appl. microbiol. biotechnol.** , 100 (2016) , pp. 9995 – 10004

HMIDET N. , JEMIL N. , NASRI M. **produção simultânea de amilase alcalina e biossurfactante por *bacillus* methylotrophicus dcs1: aplicação como aditivo de detergente biodegradação** , 30 (2019) , pp. 247 – 258

KUYUKINA, M.S.; Ivshina I.B.; Philp J.C.; Christofi N.; Dunbar S.A.; Ritchkova, M.I. **Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. Journal of Microbiol Methods**. Vol 46, 109-120. Holanda 2001.

NITSCHKE, MARCIA E PASTORE, GLÁUCIA MARIA **Biossurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova (2002**), v. 25, n. 5 [Acessado 2 Dezembro 2021] , pp. 772-776. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>. Epub 13 Nov 2002. ISSN 1678-7064. https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013.

SARUBBO, LEONIE & LUNA, JULIANA & CAMPOS-TAKAKI, GALBA. (2006). **Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of Candida glabrata UCP 1002. Electronic Journal of Biotechnology**. 9. 10.4067/S0717-34582006000400008.

SANTIAGO, M. G.; LINS, U. M. B. L.; TAKAKI, G. M. C.; FILHO, L. O. C.; ANDRADE, R. F. S. **Produção de biossurfactante por Mucor circinelloides UCP 0005 usando novo meio de cultura formulado com cascas de jatobá (Hymenaea courbaril L.)** e milhocina. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.5, p. 51292-51304 may. 2021 Willumsen, P. A. e Karlson, U. 1997. **Screening of bacteria, isolated from PAH contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. Biodegradation**, 7: 415 – 423.

CAPÍTULO 7

PRODUTOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DE DROGAS CONTRA TUBERCULOSE: UMA REVISÃO DE ESTUDOS UTILIZANDO MODELOS ANIMAIS

Data de aceite: 01/02/2022

João Victor de Souza Lima
Curso de graduação em Biomedicina, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

João Gabriel Matos da Silva
Curso de graduação em Biomedicina, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Daniel Lima Pereira
Curso de graduação em Biomedicina, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Amanda Caroline de Souza Sales
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Lucas dos Santos Silva
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Bruna Sthefanny da Cunha Ferreira
Curso de graduação em Biomedicina, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Maria Caroliny dos Santos Vale
Curso de graduação em Biomedicina, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Larissa Araújo Lopes
Curso de graduação em Biomedicina, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

José Manuel Noguera Bazán
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Diana Messala Pinheiro da Silva Monteiro
Programa de Pós-graduação em Gestão de Programas e Serviços de Saúde, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Erika Alves da Fonseca Amorim
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Adrielle Zagmignan
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade CEUMA
Programa de Pós-graduação em Gestão de Programas e Serviços de Saúde, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

Luís Cláudio Nascimento da Silva
Curso de graduação em Biomedicina, Universidade CEUMA
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade CEUMA
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade CEUMA
São Luís, MA, Brasil

RESUMO: A tuberculose (TB) é uma doença milenar causada por *Mycobacterium tuberculosis*, um patógeno versátil e bem adaptado ao ser humano. Apesar de todos os avanços na prevenção (incluindo a disponibilidade de vacina neonatal), tratamento e diagnóstico, a TB ainda é considerada a principal causa de problemas de saúde e uma das principais causas de morte em todo o mundo. O surgimento de cepas resistentes aos medicamentos ressaltou a necessidade de desenvolver novos agentes antimicobacterianos. Os produtos naturais são apontados como excelentes alvos na prospecção de agentes antimicrobianos. Neste contexto, este capítulo tem como objetivo revisar estudos aplicando compostos de origem natural que possuem efeitos demonstrados em modelos experimentais de tuberculose usando animais. Para isso, foram pesquisados artigos publicados entre 2015 e 2021 no portal *Pubmed* (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/) utilizando os seguintes descritores em língua inglesa: *"M. tuberculosis"*, *"antimicrobial activity"*, "*in vivo"* e "natural products". Foi observado que, apesar de diversos artigos relataram a prospecção de compostos naturais contra linhagens de *M. tuberculosis*, poucos artigos foram encontrados que utilizaram modelos de infecção para confirmação de seus achados. Estes trabalhos empregaram tanto extrato de plantas (*Ranunculi ternati*, *Euclea natalenses*, *Alstonia scholaris* e *Mucuna imbricata)*, como os compostos isolados alicina (purificada de *Allium sativum*), atrovimicina (produzida por *Streptomyces atrovirens*). Foi apresentado também a síntese de compostos derivados de griselimicina (produzida por *Streptomyces* sp.) no desenvolvimento de drogas anti-TB, além da aplicação de polissacarídeos (quitosana e goma de guar) para a formulação de nanopartículas contendo as drogas rifampicina e isoniazida. Estes estudos ilustram a importância de estudos com abordagens interdisciplinares visando a prospecção de compostos naturais de modo a impulsionar o desenvolvimento de novos recursos terapêuticos contra a tuberculose.
PALAVRAS-CHAVE: *Mycobacterium tuberculosis*, resistência aos antibióticos, alicina, atrovimicina.

ABSTRACT: Tuberculosis (TB) is an ancient disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, a versatile pathogen that is well adapted to humans. Despite the advances in prevention (including the availability of neonatal vaccine), treatment and diagnosis, TB is still considered the main cause of health problems and one of the main causes of death worldwide. The emergence of drug-resistant strains highlighted the need to develop new antimycobacterial agents. Natural products are pointed out as excellent targets in the prospect of antimicrobial agents. In this context, this chapter aims to review studies applying compounds of natural origin that have demonstrated effects in experimental models of tuberculosis using animals. For this, articles published between 2015 and 2021 on the Pubmed portal (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/) were searched using the following descriptors: "*M. tuberculosis*", "antimicrobial activity", "in vivo" and "natural products". It was observed that, although several articles reported the prospect of natural compounds against *M. tuberculosis* strains, few articles were found that used infection models to confirm their findings. These works employed both plant extracts (*Ranunculi ternati*, *Euclea natalenses*, *Alstonia scholaris* and *Mucuna imbricata*) and the isolated compounds allicin (purified from *Allium sativum*), atrovimicin (produced by *Streptomyces atrovirens*). The synthesis of compounds derived from griselimycin (produced by *Streptomyces* sp.) in the development of anti-TB drugs was also presented, in addition to the application of polysaccharides (chitosan and guar gum) for the formulation of nanoparticles

containing the drugs rifampicin and isoniazid. These studies illustrate the importance of studies with interdisciplinary approaches aimed at prospecting natural compounds in order to drive the development of new therapeutic resources against tuberculosis.
KEYWORDS: *Mycobacterium tuberculosis*, antibiotic resistance, allicin, atrovimicin.

1 I INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* é composto por pelo menos 256 espécies e 24 subespécies, conforme consulta na plataforma "The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature" (http://www.bacterio.net) (TO et al., 2020). As bactérias deste gênero são bacilos encapsulados, Gram-positivas, com alto conteúdo de guanina e citosina (G+C), aeróbias estritas e possuem uma membrana externa e são caracterizadas como álcool-ácido resistentes. A maioria das espécies são imóveis e não formam esporos (NIEDERWEIS et al., 2010; TRAAG et al., 2010).

Como tem ocorrido em outros gêneros bacterianos, um aumento constante no número de espécies de *Mycobacterium* recentemente identificadas, em particular de NTM, é observado como resultado do desenvolvimento contínuo de métodos moleculares (ESTEBAN; GARCÍA-COCA, 2017; TORTOLI, 2014). Este gênero inclui os conhecidos patógenos humanos (*Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*) e organismos ambientais conhecidos como micobactérias não-tuberculosas (NTM; por exemplo *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*) (ESTEBAN; GARCÍA-COCA, 2017; TO et al., 2020; TORTOLI, 2014). Vale ressaltar que, nos últimos anos, há um debate à cerca da divisão deste gênero em cinco: *Mycolicibacterium*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus*, *Mycobacteroides* e *Mycobacterium* (MEEHAN et al., 2021).

Dentre as micobactérias patogênicas, sem dúvidas, há um grande destaque para *M. tuberculosis* por ser o agente causador da tuberculose (TB), uma doença humana milenar (BISHT et al., 2019; CHEVALIER et al., 2014). Esta espécie é a parte do grupo denominado como "complexo *M. tuberculosis*" (MTBC), que também inclui patógenos humanos e animais como *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium microti* (BRITES; GAGNEUX, 2017; ORGEUR; BROSCH, 2018).

M. tuberculosis é uma bactéria não formadora de esporos, não móvel, aeróbia obrigatória, catalase negativa, de crescimento lento e de virulência variável (MASHABELA; DE WET; WARNER, 2019). É um microrganismo intracelular facultativo, capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de células fagocitárias, como macrófagos e modular a produção de mediadores inflamatórios como a interleucina 1β (1L-1β) e óxido nítrico (NO) (JAMAATI et al., 2017; ROMAGNOLI et al., 2018; SOUSA et al., 2020)the causative agent of tuberculosis (TB.).

Este patógeno é conhecido pela extrema capacidade de adaptação à espécie humana, graças ao desenvolvimento de uma variedade de estratégias de evasão ao sistema

imunológico (BRITES; GAGNEUX, 2015; SIA; RENGARAJAN, 2019). Desta forma, apesar de possuir similaridades com outras micobactérias com estilos de vida muito diferentes, este microrganismo adquiriu e adaptou seu repertório de vias metabólicas para persistir e se propagar dentro do hospedeiro humano (MASHABELA; DE WET; WARNER, 2019).

Uma característica de é o misterioso fenômeno de latência em que o patógeno é capaz de persistir em indivíduos assintomáticos, apenas para emergir e causar a doença muitos anos depois (CARRANZA et al., 2020; COLANGELI et al., 2020). Assim, mesmo com todos os avanços no diagnóstico, tratamento e com a disponibilidade de uma vacina neonatal, a TB ainda é considerada a principal causa de problemas de saúde e uma das principais causas de morte em todo o mundo (WHO, 2021), em especial nos indivíduos imunocomprometidos (BELL; NOURSADEGHI, 2018; MACHUCA et al., 2018). Em particular, a tuberculose pulmonar, a forma mais comum de tuberculose, é uma infecção altamente contagiosa (CHURCHYARD et al., 2017; FURIN; COX; PAI, 2019; MARTINEZ et al., 2021).

Aliado aos sofisticados mecanismos de evasão das defesas do hospedeiro (HMAMA et al., 2015; SIA; RENGARAJAN, 2019), *M. tuberculosis* é intrinsecamente resistente à muitos antibióticos, como resultado de diversas características como a presença de envelope celular espesso, ceroso e hidrofóbico e a presença de enzimas modificadoras e degradantes de fármacos (GYGLI et al., 2017; KASHYAP; SINGH; SILAKARI, 2018). Limitando o número de compostos disponíveis para tratamento da tuberculose (TIBERI et al., 2018).

Os medicamentos para TB são administrados em diferentes combinações de quatro medicamentos de primeira linha (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) que formam o núcleo dos regimes de tratamento na fase inicial de tratamento de 6-9 meses (SINGH et al., 2020). No entanto, *M. tuberculosis* tem desenvolvido continuamente mecanismos para resistir às drogas, o que levou o surgimento de linhagens com fenótipos de denominados de multidroga resistente (MDR-TB) e extensivamente resistente à drogas (XDR-TB) (PAI; MEMISH, 2016).

O aumento no número de cepas resistentes aos medicamentos existentes contra a tuberculose ressaltou a necessidade urgente de desenvolver novos agentes antimicobacterianos, em particular que possuam novos mecanismos de ação (ERNEST et al., 2021; JOANNA; MIZRAHI, 2018; TIBERI et al., 2018). Os produtos naturais (compostos derivados de plantas, animais ou microrganismos) são apontados como excelentes alvos na prospecção de agentes antimicrobianos (DA SILVA; DA SILVA; CORREIA, 2017), incluindo contra *M. tuberculosis* (KERI et al., 2015; KHAN et al., 2019; PIRES et al., 2020; T.A. PIRES et al., 2016). Neste contexto, este trabalho de revisão tem como objetivo destacar estudos aplicando compostos de origem natural que possuem efeitos demonstrados em modelos experimentais de tuberculose usando animais.

2 | UMA VISÃO GERAL SOBRE A TUBERCULOSE PULMONAR

2.1 Aspectos epidemiológicos

A tuberculose é uma das doenças contagiosas que mais afetam a humanidade, sendo declarada uma emergência de saúde global pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1993 (CHURCHYARD et al., 2017; FURIN; COX; PAI, 2019). Aproximadamente 90% dos infectados apresentam um estado clinicamente assintomático e contido que é denominado infecção latente de TB (ILTB) (BEHR et al., 2021); um subconjunto menor de indivíduos infectados apresenta TB ativa sintomática (CADENA; FORTUNE; FLYNN, 2017; CARRANZA et al., 2020).

M. tuberculosis afeta principalmente os pulmões , sendo por isso a doença pulmonar a forma de apresentação sintomática mais comum com sintomas como tosse intensa, febre e dores no peito (RAVIMOHAN et al., 2018; TORRELLES; SCHLESINGER, 2017). No entanto, a TB é uma doença multissistêmica com apresentação multifacetada (CADENA; FORTUNE; FLYNN, 2017; FOGEL, 2015). Os sistemas de órgãos mais comumente afetados incluem o sistema respiratório, o sistema gastrointestinal (SHARMA, 2020), a pele (TORRELLES; SCHLESINGER, 2017), o sistema nervoso central (SCHALLER et al., 2019), o sistema músculo-esquelético (DUNN; BEN HUSIEN, 2018), o sistema reprodutor (ANGELINE GRACE; BELLA DEVALEENAL; NATRAJAN, 2017; RAMACHANDRAN; DAS; RAZIK, 2021), os olhos (ABDISAMADOV; TURSUNOV, 2020) e o fígado (ESHIWE et al., 2019).

A tuberculose pulmonar é mais comum em adultos e há mais casos entre homens do que em mulheres (WHO, 2021). Contudo, a tuberculose pediátrica é uma ameaça global significativa à saúde e uma das dez principais causas de morte em crianças (CARVALHO et al., 2018b; FURIN, 2019), sendo é muito diferente da tuberculose adulta em epidemiologia, apresentação clínica e radiográfica e tratamento (LAMB; STARKE, 2017).

A prevalência da doença é aumentada nas áreas de grande concentração populacional e em condições socioeconômicas e sanitárias precárias (NARASIMHAN et al., 2013; WHO, 2021). A distribuição da doença é mundial, mas nos países desenvolvidos, o número de morbidade e mortalidade é decrescente (MACNEIL et al., 2020). Porém, em áreas com alto índice de infecção pelo HIV vêm aumentando o número de casos e óbitos por TB(CHUNG et al., 2021; DUARTE et al., 2018).

Até o estabelecimento da pandemia da COVID-19 (provocada pelo coronavírus SARS-COV-2), a tuberculose era a principal causa de morte em um único agente infeccioso, superando a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV/AIDS) (KOH; GELLER; VANDERWEELE, 2021; WHO, 2021; WOOLF; CHAPMAN; LEE, 2021). De fato, as estimativas dadas até o ano de 2019, indicavam que aproximadamente 10 milhões de novos casos de TB eram registrados todos os anos (WHO, 2019). No entanto, observou-se uma diminuição entre 15% a 20% no número de casos em 2020, um fato atribuído pela

adoção de medidas preventivas, como o uso de máscaras e o isolamento social, para controle da disseminação do vírus SARS-CoV-2, o que também teve um impacto positivo na transmissão de outras infecções respiratórias (WHO, 2020, 2021).

2.2 Transmissão e apresentações clínicas da doença pulmonar

A TB é transmitida de forma indireta de pessoa para pessoa pois a bacteria precisa se replicar dentro das células humanas para se disseminar para outros indivíduos e causar doenças (BUSSI; GUTIERREZ, 2019). Estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada pela tuberculose (JILANI et al., 2021).

A transmissão se dá através do ar por meio de gotículas de aerossóis que é expelido pela pessoa com TB pulmonar ativa, ao tossir, falar ou espirrar (DOWDY et al., 2014; GUINN; RUBIN, 2017). As gotículas mais pesadas depositam-se rapidamente no solo, enquanto que as mais leves (também chamadas de partículas de *Wells*) podem permanecer em suspensão por diversas horas. Assim, as partículas infectantes contendo os bacilos ao serem inaladas por pessoas sadias alcançam os alvéolos, onde os microrganismos se estabelecem (CHURCHYARD et al., 2017).

Após depositado nos alvéolos pulmonares, o bacilo pode ser eliminado imediatamente do organismo através da ação do sistema imunológico (MOULE; CIRILLO, 2020; SIA; RENGARAJAN, 2019). De fato, a resposta imune gerada para infecção é altamente protetora (em 90% dos casos) contra a tuberculose ativa, embora como se baseie essencialmente na proliferação de linfócitos auxiliares (TCD4+) com fenótipo Th1, e não possa prevenir a reinfecção (CARDONA, 2018; JASENOSKY et al., 2015). As células Th1 contribuem para a proteção da TB, secretando IFN-γ que aprimora os efeitos antimicobacterianos dos macrófagos (LYADOVA; PANTELEEV, 2015).

Como explicado anteriormente apenas aproximadamente 10% dos infectados desenvolverão uma forma sintomática da infecção (JILANI et al., 2021). A imunossupressão grave pode explicar apenas 10% desses casos de tuberculose ativa, enquanto o restante é atribuível a comorbidades, um ambiente pró-inflamatório e uma propensão genética desconhecida (CARDONA, 2018; GHANAVI et al., 2020; MÖLLER et al., 2018).

Os fatores de risco considerados mais importantes são a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), desnutrição e idade (CANETTI et al., 2020; MARTIN; SABINA, 2019; NARASIMHAN et al., 2013). Outros fatores predisponentes são diabetes, insuficiência renal crônica, exposição a poluentes, álcool, uso de drogas imunossupressoras (CREVEL; CRITCHLEY, 2021; HARRIES, 2020; NARASIMHAN et al., 2013; RUZANGI et al., 2020). Fatores socioeconômicos e comportamentais também aumentam a suscetibilidade à infecção (CHUNG et al., 2021; DUARTE et al., 2018; NARASIMHAN et al., 2013).

As formas da doença são divididas entre primária, secundária e a miliar (CARVALHO et al., 2018a; LEMOS et al., 2020). A forma primária frequentemente acontece logo após o primeiro contato da pessoa com o bacilo. Uma pequena proporção de pessoas desenvolve

uma doença ativa após a primeira exposição(ADIGUN; SINGH, 2021). Esses casos são chamados de tuberculose progressiva primária (JILANI et al., 2021). A tuberculose progressiva primária é observada em crianças, pessoas desnutridas, pessoas com imunossupressão e indivíduos em uso de esteróides por longo prazo. A TB primária está geralmente localizada na porção média dos pulmões e é conhecida como o foco de Ghon (CARVALHO et al., 2018a).

Na maioria dos indivíduos infectados, o foco Ghon entra em um estado de latência conhecido como tuberculose latente (BEHR et al., 2021). A tuberculose latente é capaz de ser reativada após imunossupressão no hospedeiro, geralmente vários anos após a infecção primária inicial, caracterizando a tuberculose secundária (CARDONA, 2016). As lesões da tuberculose secundária estão nos ápices pulmonares (ADIGUN; SINGH, 2021). A tuberculose secundária pode ocorrer em qualquer idade, mas pode ser mais frequente em adolescentes e no adulto jovem, no entanto os mecanismos relacionados à reativação do bacilo não são completamente esclarecidos (HUNTER, 2020; ZHENMING et al., 2021).

Uma proporção menor de pessoas que desenvolvem tuberculose secundária o faz após serem infectadas pela segunda vez (reinfecção), sendo mais comum em áreas onde a prevalência da doença é alta (ACKLEY et al., 2019; LIU et al., 2020). As lesões da tuberculose secundária são semelhantes tanto para reativação quanto para reinfecção em termos de localização (nos ápices pulmonares), e a presença de cavitação permite uma distinção da tuberculose progressiva primária que tende a estar nas zonas pulmonares médias e não apresenta danos teciduais marcados ou cavitação (ADIGUN; SINGH, 2021; HUNTER, 2020; JILANI et al., 2021).

Já a Tuberculose miliar resulta de uma disseminação linfohematogênica maciça de bacilos sendo caracterizada por tubérculos minúsculos evidentes na patologia macroscópica semelhante a sementes de milho em tamanho e aparência (SHARMA; MOHAN, 2017). As manifestações clínicas da TB miliar são multifacetadas e inespecíficas. É um estágio grave de contágio, potencialmente fatal, que ocorre em pacientes imunocomprometidos, por exemplo, indivíduo infectado com o vírus HIV (RAY et al., 2013; SHARMA; MOHAN; SHARMA, 2016).

3 | *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E A RESISTÊNCIA ÀS DROGAS

O tratamento da tuberculose dura no mínimo seis meses, variando em alguns casos, e está disponível no Sistema Único de Saúde (SUS), devendo ser realizado, preferencialmente, em regime de Tratamento Diretamente Observado (TDO) (SILVA; MOURA; CALDAS, 2014; SOARES et al., 2020). A padronização do tratamento da tuberculose ocorreu por volta dos anos 70 dividindo os 2 primeiros meses como fase intensiva, acompanhado do esquema rifampicina (inibidor da RNA polimerase), isoniazida (inibe a biossíntese de ácido micólico da parede celular), pirazinamida (o exato mecanismo

de ação é desconhecido, age somente em meio ácido e contribui para eliminar bacilos presentes dentro de macrófagos) e etambutol (inibe o transporte dos ácidos micólicos), e os últimos 4 meses apenas R-H como uma dose fixa combinada, a fase de manutenção (DA SILVA; MELLO; FIGUEIREDO, 2017).

A cura é alcançada em média por 70% dos acometidos, ficando abaixo dos 85% recomendados pela OMS para assegurar o controle da doença(DA SILVA; MELLO; FIGUEIREDO, 2017; SILVA; MOURA; CALDAS, 2014). Vários motivos são responsáveis pelo fracasso da terapia de TB, como (i) diagnóstico tardio, (ii) falta de administração oportuna e adequada de medicamentos eficazes, (iii) menor disponibilidade de medicamentos menos tóxicos, baratos e eficazes, (iv) longa duração do tratamento, (v) não adesão ao regime medicamentoso e (vi) evolução de cepas de TB resistentes aos medicamentos (KHAWBUNG; NATH; CHAKRABORTY, 2021; SANTOS et al., 2021; SILVA; MOURA; CALDAS, 2014).

A emergência de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes aos medicamentos representa um desafio significativo para os programas de tratamento e controle da tuberculose (SINGH et al., 2020). O tratamento desses casos requer medicamentos de segunda linha, que são menos eficazes, mais caros e mais tóxicos, bem como uma infraestrutura sofisticada para testes de suscetibilidade aos medicamentos que não estão prontamente disponíveis em ambientes com recursos limitados (GYGLI et al., 2017; POLSFUSS et al., 2019). As taxas de sucesso do tratamento da TB de casos causados por variantes MDR/XDR de *M. tuberculosis* são alarmantemente baixas, com apenas 54% de MDR e 28% de extensivamente resistentes a medicamentos (COHEN et al., 2019; SINGH et al., 2020).

M. tuberculosis desenvolve resistência aos medicamentos exclusivamente por meio de mutações cromossômicas, em particular polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (MCGRATH et al., 2014). No entanto, a transferência horizontal de determinantes de resistência também é possível. Essas mutações cromossômicas podem conferir resistência ao medicamento por meio da modificação ou superexpressão do alvo do medicamento, bem como pela prevenção da ativação do pró-medicamento (GYGLI et al., 2017).

As linhagens são classificadas como multirresistentes (MDR-TB) quando são resistentes aos medicamentos de primeira linha rifampicina e isoniazida (MIOTTO et al., 2018). Já as linhagens XDR, além da falta de sensibilidade à rifampicina e isoniazida, possuem resistência às fluoroquinolonas (como levofloxacina ou moxifloxacina) e qualquer aminoglicosídeo/peptídeo cíclico injetável de segunda linha (GYGLI et al., 2017). Os aminoglicosídeos de segunda linha são amicacina, capreomicina, canamicina (SINGH et al., 2020).

4 | PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO *IN VIVO* CONTRA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Nesta seção serão apresentados os trabalhos mais recentes envolvendo produtos naturais com ação contra *M. tuberculosis* confirmada em modelos animais. Para isso, foram pesquisados artigos publicados entre 2015 e 2021 no portal *Pubmed* (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/) utilizando os seguintes descritores em língua inglesa: *"M. tuberculosis"*, *"antimicrobial activity"*, "*in vivo"* e "natural products". Inicialmente, foi observado que, apesar de diversos artigos relataram a prospecção de compostos naturais contra linhagens de *M. tuberculosis* (ABEDINZADEH; GAEINI; SARDARI, 2015; GARCÍA et al., 2012; LEE; SUH, 2016), poucos artigos foram encontrados, a partir dos descritores selecionados, que utilizaram modelos de infecção para confirmação de seus achados sendo então incluídos neste estudo.

Os efeitos anti-*M. tuberculosis* de extratos obtidos de *Ranunculi ternati* Radix, uma planta medicinal Chinesa, foram investigados em um modelo de tuberculose crônica em camundongos (ZHANG et al., 2015). Um estudo anterior havia demonstrado que esta planta possui efetividade em ratos infectados por uma linhagem de MDR-TB (LU et al., 2013). Zhang et al. (2015) demonstraram que a fração enriquecida através de resina macroporosa do extrato etanólico de *R. ternati* (EEPMR) apresentou ação *in vitro* superior aos outros extratos. Nos ensaios *in vivo*, não foram encontrados indícios de toxicidade aguda para EEPMR na dose de 12,0 g/kg. EEPMR também apresentou importante efeito terapêutico no modelo de tuberculose crônica em camundongos (ZHANG et al., 2015).

Euclea natalenses A.DC. é uma amplamente distribuída por todo o sul da África, que tem sido amplamente utilizada (decocções feitas a partir das partes das plantas) por comunidades indígenas para o tratamento de sintomas relacionados à tuberculose, além de outros usos medicinais (MAROYI, 2017). Baseado nisto, um estudo demonstrou que o extrato etanólico obtido dos brotos de *E. natalenses* possui efeitos anti-*M. tuberculosis in vitro* e em camundongos. Outros achados importantes neste trabalho foram a atividade imunomoduladora e protetora frente ao dano hepático induzido por isoniazida e rifampicina, duas drogas utilizadas no tratamento da tuberculose (LALL et al., 2016). É válido ressaltar que diversos constituintes químicos purificados de *E. natalenses* foram reportados com ação inibitória *in vitro* frente à *M. tuberculosis*: diospyrin (LALL et al., 2003, 2005; LALL; MEYER, 2001), Shinanolone (WEIGENAND et al., 2004), 7-methyljuglone (BAPELA et al., 2006; LALL et al., 2005; MAHAPATRA et al., 2007).

Barua e colaboradores (2016) analisaram a atividade antimicobacteriana em modelo murino de extratos metanólicos preparados a partir de folhas de *Alstonia scholaris* e *Mucuna imbricata*. Os autores avaliaram os efeitos dos extratos vegetais sozinhos e em combinação com rifampicina. Os dados indicam que o extrato metanólico de *A. scholaris* possui potencial atividade antimicobacteriana, em especial quando em combinação com

rifampicina (BARUA et al., 2016).

O alho (*Allium sativum*) é outra planta reconhecida por possuir atividade antimicobacteriana contra linhagens de *M. tuberculosis*, incluindo aquelas com fenótipo de multirresistência (HANNAN et al., 2011). O seu composto ativo, a alicina, também tem sido reportado como agente antagonista a diversos microrganismos (CHOO et al., 2020). Em relação à tuberculose, foi demonstrado que a alicina não apenas reduziu a carga bacteriana nos pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis*, mas também induziu forte imunidade anti-tubercular através da indução dos mecanismos associados à resposta Th1 (DWIVEDI et al., 2019).

Em outro estudo foi relatado a purificação da atrovimicina, um ciclodepsipeptídeo contendo uma única cadeia acil cinâmica hidroxilada vicinal, a partir de *Streptomyces atrovirens* LQ13. Os autores reportaram que atrovimicina apresenta atividade antitubercular contra *M. tuberculosis* H37Rv tanto *in vitro* como *in vivo* (LIU et al., 2019). Outro composto de origem natural com ação promissora contra tuberculose é griselimicina, produzido por espécies de *Streptomyces.* Derivados da griselimicina têm sido desenhados para melhorar suas características farmacológicas (HOLZGRABE, 2015). O mecanismo de ação destas moléculas é a inibição da proteína DnaN (grampo-β da DNA polímerase). Em combinação com outras drogas, derivados da griselimicina apresentaram alta potência em camundongos com TB e outras micobactérias (ARAGAW et al., 2021; KLING et al., 2015).

Produtos naturais também podem auxiliar na formulação de novos dispositivos para administração de drogas antituberculose. Por exemplo, nanopartículas de quitosana revestida com goma de guar contendo rifampicina e isoniazida foram desenvolvidas visando a administração intrapulmonar. Estas nanoestruturas foram avaliadas em um modelo de tuberculose experimental. Os resultados obtidos pelo grupo revelaram que as nanopartículas formuladas apresentaram alta absorção celular e biodistribuição, efeitos condizentes com a redução significativa na carga bacteriana dos camundongos infectados por *M. tuberculosis*. O estudo histopatológico demonstrou que nenhum do grupo tratado mostra qualquer evidência de anormalidade do tecido pulmonar (GOYAL et al., 2016).

5 | CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

No presente capítulo foram discutidos estudos envolvendo a aplicação de produtos naturais em modelos experimentais de tuberculose. Apesar da grande disponibilidade de artigos relatando ações inibitórias promissoras de compostos naturais frente ao patógeno *M. tuberculosis*, são escassos os estudos avaliando os efeitos destes potenciais agentes em modelos de infecção. Este cenário ilustra a importância de estudos com abordagens interdisciplinares (pesquisas etnofarmacológicas, estudos *in vitro* e abordagens *in silico*) visando a prospecção de compostos naturais de modo a impulsionar o desenvolvimento de novos recursos terapêuticos contra a tuberculose. Espera-se que os produtos naturais

continuem a ser investigados para o tratamento da tuberculose e que essas substâncias sejam úteis no desenvolvimento de novas drogas.

REFERÊNCIAS

ABDISAMADOV, A.; TURSUNOV, O. Ocular tuberculosis epidemiology, clinic features and diagnosis: A brief review. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 124, 1 set. 2020.

ABEDINZADEH, M.; GAEINI, M.; SARDARI, S. Natural antimicrobial peptides against Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1285–1289, 20 out. 2015.

ACKLEY, S. F. et al. Multiple exposures, reinfection and risk of progression to active tuberculosis. **Royal Society open science**, v. 6, n. 3, 1 mar. 2019.

ADIGUN, R.; SINGH, R. Tuberculosis. **StatPearls**, 25 jul. 2021.

ANGELINE GRACE, G.; BELLA DEVALEENAL, D.; NATRAJAN, M. Genital tuberculosis in females. **The Indian journal of medical research**, v. 145, n. 4, p. 425–436, 2017.

ARAGAW, W. W. et al. Cyclohexyl-griselimycin is active against Mycobacterium abscessus in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, nov. 2021.

BAPELA, N. B. et al. Activity of 7-methyljuglone in combination with antituberculous drugs against Mycobacterium tuberculosis. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 13, n. 9–10, p. 630–635, 24 nov. 2006.

BARUA, A. et al. Evaluation of in vivo antimycobacterial activity of some folklore medicinal plants and enumeration of colony forming unit in murine model. **Indian journal of pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 526–530, 1 set. 2016.

BEHR, M. A. et al. Latent tuberculosis: Two centuries of confusion. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 204, n. 2, p. 142–148, 15 jul. 2021.

BELL, L. C. K.; NOURSADEGHI, M. Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis co-infection. **Nature reviews. Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80–90, 2018.

BISHT, D. et al. Recent insights into Mycobacterium tuberculosis through proteomics and implications for the clinic. **https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1608185**, v. 16, n. 5, p. 443–456, 4 maio 2019.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. **Immunological reviews**, v. 264, n. 1, p. 6–24, 1 mar. 2015.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1019, p. 1–26, 2017.

BUSSI, C.; GUTIERREZ, M. G. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. **FEMS microbiology reviews**, v. 43, n. 4, p. 341–361, 1 jul. 2019.

CADENA, A. M.; FORTUNE, S. M.; FLYNN, J. L. Heterogeneity in tuberculosis. **Nature reviews. Immunology**, v. 17, n. 11, p. 691–702, 27 out. 2017.

CANETTI, D. et al. HIV and tuberculosis: The paradox of dual illnesses and the challenges of their fighting in the history. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 122, 1 maio 2020.

CARDONA, P. J. Reactivation or reinfection in adult tuberculosis: Is that the question? **International journal of mycobacteriology**, v. 5, n. 4, p. 400–407, 1 dez. 2016.

CARDONA, P. J. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. **Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)**, v. 36, n. 1, p. 38–46, 1 jan. 2018.

CARRANZA, C. et al. Diagnosis for Latent Tuberculosis Infection: New Alternatives. **Frontiers in immunology**, v. 11, 10 set. 2020.

CARVALHO, A. C. C. et al. Aspectos epidemiológicos, manifestações clínicas e prevenção da tuberculose pediátrica sob a perspectiva da Estratégia End TB. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 2, p. 134–144, 1 mar. 2018a.

CARVALHO, I. et al. Managing latent tuberculosis infection and tuberculosis in children. **Pulmonology**, v. 24, n. 2, p. 106–114, 1 mar. 2018b.

CHEVALIER, F. LE et al. Mycobacterium tuberculosis evolutionary pathogenesis and its putative impact on drug development. **Future microbiology**, v. 9, n. 8, p. 969–985, 1 ago. 2014.

CHOO, S. et al. Review: antimicrobial properties of allicin used alone or in combination with other medications. **Folia microbiologica**, v. 65, n. 3, p. 451–465, 1 jun. 2020.

CHUNG, S. et al. The Relationship Between Socio-Demographic Factors and Tuberculosis Mortality in the Republic of Korea During 2008-2017. **Frontiers in public health**, v. 9, 20 out. 2021.

CHURCHYARD, G. et al. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl_6, p. S629–S635, 2017.

COHEN, D. B. et al. Poor outcomes in recurrent tuberculosis: More than just drug resistance? **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0215855, 2019.

COLANGELI, R. et al. Mycobacterium tuberculosis progresses through two phases of latent infection in humans. **Nature communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

CREVEL, R. VAN; CRITCHLEY, J. A. The Interaction of Diabetes and Tuberculosis: Translating Research to Policy and Practice. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 6, n. 1, 2021.

DA SILVA, L. C. N.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Editorial: New frontiers in the search of antimicrobials agents from natural products. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, 2017.

DA SILVA, V. D.; MELLO, F. C. DE Q.; FIGUEIREDO, S. C. DE A. Estimativas das taxas de recidiva, cura e abandono de tratamento em pacientes com tuberculose pulmonar tratados com esquema de dose fixa combinada de quatro drogas em uma unidade de saúde terciária na cidade do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 2, p. 113–120, 2017.

DOWDY, D. W. et al. Transforming the Fight Against Tuberculosis: Targeting Catalysts of Transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 8, p. 1123–1129, 15 out. 2014.

DUARTE, R. et al. Tuberculosis, social determinants and co-morbidities (including HIV). **Pulmonology**, v. 24, n. 2, p. 115–119, 1 mar. 2018.

DUNN, R. N.; BEN HUSIEN, M. Spinal tuberculosis: review of current management. **The bone & joint journal**, v. 100-B, n. 4, p. 425–431, 1 abr. 2018.

DWIVEDI, V. P. et al. Allicin enhances antimicrobial activity of macrophages during Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of ethnopharmacology**, v. 243, 28 out. 2019.

ERNEST, J. P. et al. Development of New Tuberculosis Drugs: Translation to Regimen Composition for Drug-Sensitive and Multidrug-Resistant Tuberculosis. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 61, p. 495–516, 6 jan. 2021.

ESHIWE, C. et al. Rare and unusual case of hepatic and disseminated tuberculosis in an immunocompetent patient. **BMJ case reports**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2019.

ESTEBAN, J.; GARCÍA-COCA, M. Mycobacterium Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 2651, 18 jan. 2017.

FOGEL, N. Tuberculosis: a disease without boundaries. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 95, n. 5, p. 527–531, 1 set. 2015.

FURIN, J. Advances in the diagnosis, treatment, and prevention of tuberculosis in children. **Expert review of respiratory medicine**, v. 13, n. 3, p. 301–311, 4 mar. 2019.

FURIN, J.; COX, H.; PAI, M. Tuberculosis. **Lancet (London, England)**, v. 393, n. 10181, p. 1642–1656, 20 abr. 2019.

GARCÍA, A. et al. Recent advances in antitubercular natural products. **European journal of medicinal chemistry**, v. 49, p. 1–23, mar. 2012.

GHANAVI, J. et al. Human genetic background in susceptibility to tuberculosis. **International journal of mycobacteriology**, v. 9, n. 3, p. 239–247, 1 jul. 2020.

GOYAL, A. K. et al. Chemotherapeutic Evaluation of Guar Gum Coated Chitosan Nanoparticle Against Experimental Tuberculosis. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 450–463, 1 mar. 2016.

GUINN, K. M.; RUBIN, E. J. Tuberculosis: Just the FAQs. **mBio**, v. 8, n. 6, 1 nov. 2017.

GYGLI, S. M. et al. Antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis: mechanistic and evolutionary perspectives. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 354–373, 1 maio 2017.

HANNAN, A. et al. ANTI-MYCOBACTERIAL ACTIVITY OF GARLIC (ALLIUM SATIVUM) AGAINST MULTI-DRUG RESISTANT AND NON-MULTI-DRUG RESISTANT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. **Article in Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 81–85, 2011.

HARRIES, A. D. Chronic kidney disease, tuberculosis and climate change. **The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 24, n. 1, p. 132–133, 1 jan. 2020.

HMAMA, Z. et al. Immunoevasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. **Immunological reviews**, v. 264, n. 1, p. 220–232, 1 mar. 2015.

HOLZGRABE, U. New Griselimycins for Treatment of Tuberculosis. **Chemistry & biology**, v. 22, n. 8, p. 981–982, 20 ago. 2015.

HUNTER, R. L. The Pathogenesis of Tuberculosis-The Koch Phenomenon Reinstated. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 10, p. 1–25, 1 out. 2020.

JAMAATI, H. et al. Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. OCT, 12 out. 2017.

JASENOSKY, L. D. et al. T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. **Immunological reviews**, v. 264, n. 1, p. 74–87, 1 mar. 2015.

JILANI, T. N. et al. Active Tuberculosis. **StatPearls**, 6 ago. 2021.

JOANNA, J. C.; MIZRAHI, V. Priming the tuberculosis drug pipeline: new antimycobacterial targets and agents. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 39–46, 1 out. 2018.

KASHYAP, A.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. Mechanistic investigation of resistance via drug-inactivating enzymes in Mycobacterium tuberculosis. **Drug metabolism reviews**, v. 50, n. 4, p. 448–465, 2 out. 2018.

KERI, R. S. et al. Recent progress in the drug development of coumarin derivatives as potent antituberculosis agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 257–269, 23 jun. 2015.

KHAN, M. T. et al. Marine Natural Products and Drug Resistance in Latent Tuberculosis. **Marine drugs**, v. 17, n. 10, 26 set. 2019.

KHAWBUNG, J. L.; NATH, D.; CHAKRABORTY, S. Drug resistant Tuberculosis: A review. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 74, 1 fev. 2021.

KLING, A. et al. Targeting DnaN for tuberculosis therapy using novel griselimycins. **Science**, v. 348, n. 6239, p. 1106–1112, 5 jun. 2015.

KOH, H. K.; GELLER, A. C.; VANDERWEELE, T. J. Deaths From COVID-19. **JAMA**, v. 325, n. 2, p. 133–134, 12 jan. 2021.

LALL, N. et al. Antimycobacterial activity of diospyrin derivatives and a structural analogue of diospyrin against Mycobacterium tuberculosis in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 435–438, 1 fev. 2003.

LALL, N. et al. Characterization of Intracellular Activity of Antitubercular Constituents the Roots of Euclea natalensis. **Pharmaceutical biology**, v. 43, n. 4, p. 353–357, jun. 2005.

LALL, N. et al. In vitro and In vivo antimycobacterial, hepatoprotective and immunomodulatory activity of Euclea natalensis and its mode of action. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 740–748, 24 dez. 2016.

LALL, N.; MEYER, J. J. M. Inhibition of drug-sensitive and drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis by diospyrin, isolated from Euclea natalensis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 78, n. 2–3, p. 213–216, 2001.

LAMB, G. S.; STARKE, J. R. Tuberculosis in Infants and Children. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 2, p. 553–557, 1 jan. 2017.

LEE, H.; SUH, J. W. Anti-tuberculosis lead molecules from natural products targeting Mycobacterium tuberculosis ClpC1. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 2–3, p. 205–212, 1 mar. 2016.

LEMOS, V. DE S. et al. Tuberculose miliar em paciente imunocompetente – Relato de caso/Miliary tuberculosis in an immunocompetent patient - Case report. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 17226–17234, 30 nov. 2020.

LIU, Q. et al. Discovery and Biosynthesis of Atrovimycin, an Antitubercular and Antifungal Cyclodepsipeptide Featuring Vicinal-dihydroxylated Cinnamic Acyl Chain. **Organic letters**, v. 21, n. 8, p. 2634–2638, 19 abr. 2019.

LIU, Y. et al. Tuberculosis relapse is more common than reinfection in Beijing, China. **Infectious diseases (London, England)**, v. 52, n. 12, p. 858–865, 2020.

LU, J. et al. Effect of Chinese herbal medicine extracts on cell-mediated immunity in a rat model of tuberculosis induced by multiple drug-resistant bacilli. **Molecular medicine reports**, v. 8, n. 1, p. 227–232, jul. 2013.

LYADOVA, I. V.; PANTELEEV, A. V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

MACHUCA, I. et al. Tuberculosis in immunosuppressed patients. **Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)**, v. 36, n. 6, p. 366–374, 1 jun. 2018.

MACNEIL, A. et al. Global Epidemiology of Tuberculosis and Progress Toward Meeting Global Targets - Worldwide, 2018. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, n. 11, p. 281–285, 20 mar. 2020.

MAHAPATRA, A. et al. Activity of 7-methyljuglone derivatives against Mycobacterium tuberculosis and as subversive substrates for mycothiol disulfide reductase. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 24, p. 7638–7646, 15 dez. 2007.

MAROYI, A. Review of Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry and Pharmacological Properties of Euclea natalensis A.DC. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 12, 1 dez. 2017.

MARTIN, S. J.; SABINA, E. P. Malnutrition and Associated Disorders in Tuberculosis and Its Therapy. **Journal of dietary supplements**, v. 16, n. 5, p. 602–610, 2019.

MARTINEZ, L. et al. Transmission Dynamics in Tuberculosis Patients With Human Immunodeficiency Virus: A Systematic Review and Meta-analysis of 32 Observational Studies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 9, p. e3446–e3455, 2 nov. 2021.

MASHABELA, G. T.; DE WET, T. J.; WARNER, D. F. Mycobacterium tuberculosis Metabolism . **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, 16 ago. 2019.

MCGRATH, M. et al. Mutation rate and the emergence of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 2, p. 292–302, fev. 2014.

MEEHAN, C. J. et al. Reconstituting the genus Mycobacterium. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 71, n. 9, 2021.

MIOTTO, P. et al. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. **Respirology (Carlton, Vic.)**, v. 23, n. 12, p. 1098–1113, 1 dez. 2018.

MÖLLER, M. et al. Genetic Resistance to Mycobacterium tuberculosis Infection and Disease. **Frontiers in immunology**, v. 9, 27 set. 2018.

MOULE, M. G.; CIRILLO, J. D. Mycobacterium tuberculosis Dissemination Plays a Critical Role in Pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 65, 25 fev. 2020.

NARASIMHAN, P. et al. Risk factors for tuberculosis. **Pulmonary medicine**, v. 2013, 2013.

NIEDERWEIS, M. et al. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 3, p. 109, mar. 2010.

ORGEUR, M.; BROSCH, R. Evolution of virulence in the Mycobacterium tuberculosis complex. **Current opinion in microbiology**, v. 41, p. 68–75, 1 fev. 2018.

PAI, M.; MEMISH, Z. A. Antimicrobial resistance and the growing threat of drug-resistant tuberculosis. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 6, n. 2, p. 45, 1 jun. 2016.

PIRES, C. T. A. et al. Structure-activity relationship of natural and synthetic coumarin derivatives against Mycobacterium tuberculosis. **Future medicinal chemistry**, v. 12, n. 17, p. 1533–1546, 1 set. 2020.

POLSFUSS, S. et al. Emergence of Low-level Delamanid and Bedaquiline Resistance During Extremely Drug-resistant Tuberculosis Treatment. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 69, n. 7, p. 1229–1231, 13 set. 2019.

RAMACHANDRAN, A.; DAS, C. J.; RAZIK, A. Male genital tract tuberculosis: A comprehensive review of imaging findings and differential diagnosis. **Abdominal radiology (New York)**, v. 46, n. 4, p. 1677–1686, 1 abr. 2021.

RAVIMOHAN, S. et al. Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. **European Respiratory Review**, v. 27, n. 147, 31 mar. 2018.

RAY, S. et al. Diagnosis and management of miliary tuberculosis: Current state and future perspectives. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 9, n. 1, p. 9–26, 2013.

ROMAGNOLI, A. et al. Clinical isolates of the modern Mycobacterium tuberculosis lineage 4 evade host defense in human macrophages through eluding IL-1β-induced autophagy article. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2018.

RUZANGI, J. et al. The association between chronic kidney disease and tuberculosis; a comparative cohort study in England. **BMC nephrology**, v. 21, n. 1, 1 out. 2020.

SANTOS, D. A. DA S. et al. FATORES ASSOCIADOS AO ABANDONO DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR. **Cogitare Enfermagem**, v. 26, 29 out. 2021.

SCHALLER, M. A. et al. Central Nervous System Tuberculosis : Etiology, Clinical Manifestations and Neuroradiological Features. **Clinical neuroradiology**, v. 29, n. 1, p. 3–18, 8 mar. 2019.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A. Miliary Tuberculosis. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 2, 10 mar. 2017.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A.; SHARMA, A. Miliary tuberculosis: A new look at an old foe. **Journal of clinical tuberculosis and other mycobacterial diseases**, v. 3, p. 13–27, 1 maio 2016.

SHARMA, V. Differentiating intestinal tuberculosis and Crohn disease: Quo Vadis. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 8, p. 647–650, 2 ago. 2020.

SIA, J. K.; RENGARAJAN, J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 4, 16 ago. 2019.

SILVA, P. D. F.; MOURA, G. S.; CALDAS, A. DE J. M. Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose pulmonar no Maranhão, Brasil, no período de 2001 a 2010. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 8, p. 1745–1754, 1 ago. 2014.

SINGH, R. et al. Recent updates on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Journal of applied microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1547–1567, 1 jun. 2020.

SOARES, L. N. et al. Relação entre multimorbidade e o desfecho do tratamento da tuberculose pulmonar. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 41, p. e20190373, 5 jun. 2020.

SOUSA, J. et al. Mycobacterium tuberculosis associated with severe tuberculosis evades cytosolic surveillance systems and modulates IL-1β production. **Nature communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

T.A. PIRES, C. et al. Anti-Mycobacterium tuberculosis Activity of Calophyllum brasiliense Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Conventional Techniques. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 532–539, 20 jan. 2016.

TIBERI, S. et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. e183–e198, 1 jul. 2018.

TO, K. et al. General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus. **Journal of Clinical Medicine 2020, Vol. 9, Page 2541**, v. 9, n. 8, p. 2541, 6 ago. 2020.

TORRELLES, J. B.; SCHLESINGER, L. S. Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 8, p. 688–697, 1 ago. 2017.

TORTOLI, E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus Mycobacterium. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 727–752, 1 out. 2014.

TRAAG, B. A. et al. Do mycobacteria produce endospores? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 2, p. 878, 2010.

WEIGENAND, O. et al. Antibacterial activity of naphthoquinones and triterpenoids from Euclea natalensis root bark. **Journal of natural products**, v. 67, n. 11, p. 1936–1938, nov. 2004.

WHO. **Global tuberculosis report 2019**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565714>. Acesso em: 20 nov. 2021.

WHO. **Global tuberculosis report 2020**. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/9789240013131>. Acesso em: 20 nov. 2021.

WHO. **Global tuberculosis report 2021**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>. Acesso em: 20 nov. 2021.

WOOLF, S. H.; CHAPMAN, D. A.; LEE, J. H. COVID-19 as the Leading Cause of Death in the United States. **JAMA**, v. 325, n. 2, p. 123–124, 12 jan. 2021.

ZHANG, L. et al. In vitro and in vivo study of anti-tuberculosis effect of extracts isolated from Ranunculi Ternati Radix. **Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases : Official Journal of WASOG**, v. 31, n. 4, p. 336–342, 5 jan. 2015.

ZHENMING, L. et al. Pathogenesis of Secondary Pulmonary Tuberculosis and Role of Cord Factor in Secondary Infection. **Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae**, v. 43, n. 3, p. 452–461, 30 jun. 2021.

CAPÍTULO 8

RIZOBACTÉRIAS PARA A CONSERVAÇÃO DA *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 21/12/2021

Beatriz Silva Santiago
Universidade Federal do Pará
Belém– Pará
https://orcid.org/0000-0002-8376-5484

Monyck Jeane dos Santos Lopes
Museu Paraense Emilio Goeldi
Belém – Pará
https://orcid.org/0000-0003-3092-6683

Ila Nayara Bezerra da Silva
Universidade Federal Rural da Amazônia
Belém – Pará
https://orcid.org/0000-0003-3346-7531

Ely Simone Cajueiro Gurgel
Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG)
Belém - Pará
https://orcid.org/0000-0002-9488-7532

RESUMO: Nos últimos anos há o avanço vertiginoso da mineração, exploração madeireira e dos desmatamentos de maneira avassaladora, tais fatores vêm favorecendo a dissipação do desmesurado potencial do patrimônio de diversidade biológica, imprescindível para o estabelecimento do paradigma da nova revolução biotecnológica. Diante desse cenário, existe a urgente necessidade de alcançar novas estratégias que possam garantir a conservação das espécies e o funcionamento de ecossistemas em longo prazo. A espécie de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr, popularmente conhecida como amarelão, é uma espécie florestal nativa amplamente recomendada para diversos fins devido à alta qualidade da madeira, têm potencial apícola e é promissora em programas de enriquecimento florestal e de recuperação de áreas degradadas. Uma estratégia para conservar essa espécie seria usar rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR). O objetivo deste capitulo é fazer uma breve revisão acerca do potencial benéfico de usar rizobactérias para a conservação de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr.

PALAVRAS-CHAVE: Rizobactérias; Microbiota do solo; Amarelão; Conservação ambiental.

RHIZOBACTERIA IN *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr. CONSERVATION

ABSTRACT: In recent years there has been an increase in mining, logging, and deforestation, favoring the dissipation of biodiversity. In this scenario, the use of new strategies aimed at the conservation of species and ecosystems is essential. *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr., is a native forest species, widely recommended for various purposes, due to the high quality of the wood. It has beekeeping potential, is promising in forest enrichment programs and the recovery of degraded areas. This species would be to conservation by using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). The objective of this chapter is to briefly review the potential benefits of PGPR in *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr. conservation.

KEYWORDS: Rhizobacteria; Soil microbiota; Yellowish; Environmental Conservation.

1 I INTRODUÇÃO

Nos últimos anos há o avanço vertiginoso da mineração, da exploração madeireira e dos desmatamentos de maneira avassaladora, tais fatores vêm favorecendo a dissipação do desmesurado potencial do patrimônio de diversidade biológica, imprescindível para o estabelecimento do paradigma da nova revolução biotecnológica. A exploração de espécies nativas madeireiras se concentra predominantemente na extração de florestas naturais, e a exploração madeireira na região Amazônica tem como uma de suas principais características a falta ou reduzida reposição das espécies exploradas. Diante desse cenário, existe a urgente necessidade de alcançar novas estratégias que possam garantir a conservação das espécies e o funcionamento dos ecossistemas em longo prazo (GALINDO et al., 2015; RODRIGUES, 2020; OTT, 2021).

A presença da madeira ao longo do seguimento da história humana mostra seu valor entre as principais matérias primas que sustentam a vida no planeta. As diversas maneiras do seu uso, a procura crescente e a oferta natural vindo a ser cada vez mais escassa, conduziram às mudanças culturais e tecnológicas necessárias à sua obtenção. Por isso, estudos relacionados a biotecnologia, como o uso de rizobactérias, vem sendo mais recorrentes e apresentados como uma alternativa sustentável (IBÁ, 2019; DELVAUX et al., 2021; LOPES et al., 2021a).

A espécie *Apuleia leiocarpa*, popularmente conhecida como Amarelão, Mitaroá, Cumaru Cetim, Grápia ou Garapa, pertencente à família Fabaceae, é encontrada nos biomas da Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado. Devido a cor amarela do seu tronco é uma árvore facilmente encontrada dentro de florestas dessa forma sofre com a intensiva exploração para extração de madeira. A desintegração do seu habitat e pela maneira que suas sementes germinam de forma lenta e irregular, a presença da espécie é interrompida e vem sendo ameaçada de extinção. Outra concepção relevante sobre a espécie é que a produção de mudas é dificultada pela característica de suas sementes e requer tratamentos específicos de quebra de dormência, a fim de igualar sua germinação, a frutificação irregular e por ser uma árvore de grande altura o que complica a coleta de frutos, pensando nisso nos últimos anos vem sendo estudadas técnicas alternativas para a regeneração da espécie (BRAGA et al., 2021).

As rizobactérias são encontradas na rizosfera, que é o local do solo mais próximo a raiz da planta. Essa região é rica em nutrientes e microrganismos, como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR). As rizobactérias são benéficas às plantas por promoverem seu desenvolvimento devido à produção de fitormônios, a produção de sideróforos e também de antibióticos, a mobilização fosfato e a resistência sistêmica a patógenos que atuam no controle biológico de doenças (LOPES et al., 2021a). Entre as PGPR, destaca-se as bactérias solubilizadoras de fosfatos e as fixadoras de nitrogênio, essas têm importância para plantas cultivadas pois aumentam a absorção de nitrogênio

e de fósforo realizando um papel essencial como biofertilizantes. Porém, infelizmente os estudos acerca da diversidade de microrganismos presentes no solo, a sua composição e funcionamento, são complexos por causa da heterogeneidade física, química e biológica dos solos e também devido as relações entre a quantidade de espécies e a pluralidade de microrganismos presentes no solo (DELVAUX et al., 2021; CARGNELUTTI, 2021).

Nesse sentido o objetivo deste capitulo é fazer uma breve revisão acerca dos benefícios das rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR), de maneira que possa demonstrar seu potencial para a conservação de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr.

2 | REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância de estudar a biodiversidade

O Brasil, é um dos países mais ricos em biodiversidade do mundo, tendo 55% de cobertura vegetal nativa e 15% da água doce do planeta. Essa biodiversidade reforça uma maior atenção paras as políticas orientadas para a conservação e o uso sustentável dos biomas, já que 60% das espécies ameaçadas de extinção estão em territórios protegidos, e aproximadamente 75% das áreas federais de conservação abrigam tais populações contudo parece que o brasileiro ainda não se deu conta da riqueza incalculável que o país abriga e que o futuro da humanidade está nas mãos da sociedade como um todo (VIEIRA, 2014; TESTA et al., 2020).

O bioma Amazônico detém uma importante relevância de caráter biológico e socioambiental para o mundo, abriga grande diversidade de espécies da flora, fauna e de conhecimentos tradicionais de comunidades locais, o que é capaz de influenciar na manutenção do equilíbrio ambiental do planeta. Os problemas relacionados à devastação ambiental é um risco à biodiversidade amazônica isso porque essa biodiversidade é um patrimônio que merece ser protegido, representa uma valiosa fonte ao desenvolvimento sustentável nos planos regional, nacional e mundial (BERTOLDI et al., 2020; MATHEUS, 2020).

O uso inadequado dos recursos naturais advindo de atividades agrícolas intensivas pode provocar processo de degradação ambiental sem precedentes, podendo ocasionar o esgotamento dos recursos naturais e consequentemente a perda da biodiversidade, portanto é necessário estudos sobre técnicas que minimizem o impacto decorrente do uso e manejo do solo para poderem serem aplicadas para minimizar os efeitos da degradação ambiental (NUNES et al. 2012).

2.2 Caracterização de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr

Apuleia leiocarpa (Vogel) J. F. Macbr é uma espécie florestal nativa, amplamente

recomendada para diversos fins, devido à alta qualidade da madeira. Têm potencial apícola, fitomedicinal, é promissora em programas de enriquecimento florestal e de recuperação de áreas degradadas (CASTRO et al., 2017). É uma árvore decidual de grande porte, de até 40m de altura, com fustes longos e retos de até 1m ou mais de diâmetro e copas pequenas, possui uma casca cinza-claro, descamante em placas deixando cicatrizes com lenticelas, com folhas alternas, imparipenadas, com 7 a 11 folíolos alternos, elípticos, de até 3,5cm de comprimento. A casca é muito usada para a extração de tanino, madeira de lei, dura e pesada, com uma cor bege-amarelada, possui múltipla aplicação: tonéis e pipas, construção civil externa e interna, marcenaria, construção naval (TASKKA, 2016).

O fruto é simples, formado por uma vagem (legume) oblonga ou ovado-oblonga**,** de coloração castanho-clara, seca e indeiscente, ápice e base agudos, superfície lisa, brilhante (Figura 1). Externamente, as sementes possuem formato elíptico, aplainado, com tegumento de coloração castanho-brilhante, às vezes mais ou menos escuro, espesso, glabro**,** com presença de cicatriz linear visível (hilo), de cor castanho-clara, em geral tende ter no tamanho das sementes de 4 a 5,8 cm de comprimento e 1,65 a 2 cm de largura contudo nas dimensões de frutos e sementes da *Apuleia leiocarpa* geralmente se obtém ampla variação. Em determinadas épocas as sementes apresentam alta infestação de brocas e são avidamente consumidas por roedores e periquitos, prejudicando a sua regeneração natural (LOUREIRO, 2004; FELIPPI et al. 2012; TASKKA, 2016).

A germinação geralmente é caracterizada como epígea e as plântulas são do tipo fanerocotiledonar com emergência curvada, embora os cotilédones possam permanecer parcialmente envolvidos pelo tegumento seminal, a germinação tem início entre 10° e 30° dia após a semeadura, levando até 80 dias para germinar sem tratamento pré-germinativo adequado (CARVALHO, 2003; FELIPPI et al., 2012).

Figura 1. Árvore (a), fruto (b) e semente (c) de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr.

Fonte: Monyck Lopes; Árvores do Brasil, 2020; Anita Stival, 2018.

2.3 Microbiota do solo

A microbiologia do solo é a ciência que estuda organismos extremamente pequenos que habitam o solo e contribuem para os chamados serviços ecossistêmicos, sendo de suma importância para a agricultura, ajudando ativamente na melhoria e manutenção da qualidade do solo (CARGNELUTTI, 2021). Os serviços ecossistêmicos são resultantes da atividade biológica de determinados grupos de organismos, além dos fungos no solo encontramos numerosos gêneros de bactérias, muitas das quais realizam funções importantes no ciclo de nutrientes e também protegem as culturas contra doenças. A seleção e adequação dessa comunidade microbiana a ambientes em circunstâncias de estresse auxiliam o processo de regeneração, principalmente em áreas devastadas logo os microrganismos são benéficos ao meio ambiente, e considerados de extrema importância e indispensáveis para a manutenção dos ecossistemas (OLIVEIRA et al., 2019; JUNIOR et al., 2021).

Em relação aos solos brasileiros, este tipo de estudo se faz necessário uma vez que é sobre tais solos e seus respectivos microbiomas que sustentam biomas de grande biodiversidade, ou mesmo áreas de cultivo agrícola com elevada produtividade e importância econômica. Pode-se ainda extrapolar o conceito de microbioma, considerando-o não apenas como o conjunto de organismos presentes em uma área distinta, mas associado aos diferentes solos sobre os quais se desenvolve a mesma cultura agrícola ou que integram a mesma paisagem, inserindo assim o conceito de biogeografia na definição de microbioma (FIERER et al., 2006).

A biomassa microbiana é considerada um excelente bioindicador de qualidade dos solos, uma vez que atua nos processos biogeoquímicos, refletindo o nível de degradação ou alterações na qualidade do solo e do ambiente, o solo rizosférico é totalmente rico em microrganismos de suma importância para o manejo da agricultura, que ajudam na absorção dos nutrientes do solo necessários para a planta como por exemplo o fósforo, logo é uma alternativa sustentável para o não uso de agrotóxicos e fertilizantes utilizados nos sistemas agrícolas tradicionais (HOFFMANN et al., 2018; ROCHA, 2020).

2.4 Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR)

Os microrganismos presentes na rizosfera são constituídos por um subgrupo de filos bacterianos, ainda que as comunidades de cada região sejam diferentes entre si, em relação a ordens, famílias, gêneros e/ou espécies, as rizobactérias, são conhecidas por estimularem o crescimento vegetal. Benefícios com potencial para serem empregadas no controle biológico de fitopatógenos, no aproveitamento mais eficiente de fertilizantes, como rizoremediadoras e na degradação de compostos nocivos às plantas (GALINDO et al., 2015). O uso das bactérias promotoras de crescimento na agricultura é otimizador do incremento do crescimento da planta, especialmente sob condições limitantes (CARDOSO

et al., 2019; LOPES et al., 2021b).

Em uma pesquisa, Medeiros et al. (2017), realizaram um experimento de inoculação, com rizobactérias da espécie *Azospirillum lipoferum* em sementes da espécie de *Myracrodruon urundeuva* Allemão. Foi obtido que tratamentos com inóculo de PGPR que estavam sob sol tiveram maior resistência a alta irradiância solar do que os tratamentos sem inóculo, dessa maneira é possível observar que o estresse causado pela irradiância do sol foi minimizado a partir do uso das PGPR nos tratamentos. Assim é possível evidenciar como a utilização das rizobactérias podem aumentar a resistência das plantas em relação aos estresses abióticos.

As rizobactérias (PGPR) são de vida livre, simbióticas ou endofíticas, possuem várias habilidades que as caracterizam como benéficas para as culturas ou plantas como um todo e produzem substâncias inibitórias, como antibióticos, ácidos orgânicos, sideróforos, antifúngicos e bacteriocinas, essas bactérias favorecem o crescimento das plantas e proporcionam uma melhor adaptação no campo além de promover um aumento substancial da área radicular, o que permite maior eficiência na retirada de água e macro e micronutrientes podendo apresentar ainda um relativo efeito adverso sobre muito microrganismos patogênicos (BOMPADRE et al., 2014; CESA-LUNA et al., 2020; MOIN et al., 2020).

As bactérias são capazes de sintetizar nutrientes como o fosfato, que é responsável pelo armazenamento e transferência de energia como, por exemplo, a glicose, frutose e ATP, é um nutriente de suma importância para o crescimento das plantas porém em geral os solos apresentam deficiência de fósforo (NUNES, 2019). As PGPR conseguem solubilizar o fosfato de forma inorgânica como consequência da liberação de ácidos orgânicos secretados por diferentes gêneros bacterianos pois esses ácidos competem com o fosfato pelos sítios de adsorção no solo, aumentando a disponibilidade desse elemento para os vegetais, o fosfato além de incrementar o desenvolvimento vegetal também reduz a necessidade do uso de fertilizantes manufaturados diminuindo os impactos ambientais (AWAIS et al., 2017; PREININGER et al., 2018; YU et al., 2019).

Outra produção importante são os fitormônios que estimulam o desenvolvimento vegetal, o ácido indol acético (AIA), no qual as rizobactérias auxiliam na produção, estimula a divisão celular, o alongamento das células, diferenciação celular, respostas gravitacionais, regulação, queda de folhas, amadurecimento e oferece maior proteção para as plantas sobre estresses, o AIA serve como um agente de regulação de diferenciação de células microbianas. As PGPR são bem conhecidas pela capacidade de sintetizar auxinas, é relatado que 80% dos microrganismos isolados da rizosfera de diversas culturas possuam a habilidade de sintetizar e secretar estes compostos, alguns gêneros de bactérias com capacidade de síntese de AIA já foram descritas, como: *Acinetobacter, Aeromonas, Agrobacterium, Azospirillum, Bacillus, Bradyrhizobium, Burkholderia, Curtobacterium, Enterobacter, Kocuria, Gluconacetobacter, Pantoea, Pseudomonas, Rhizobium e*

Xanthomonas, todas mostrando grande potencial de promoção de crescimento vegetal através da produção deste fitormônio (QUECINE et al., 2014; BATISTA et al., 2018; PARRAY; MIR; SHAMEEM, 2019).

3 I CONLUSÃO

Nesse sentido é possível observar que o uso de rizobactérias traz inúmeros benefícios para as plantas, auxiliando no seu crescimento de tal forma que a torna uma alternativa sustentável para a conservação ambiental. O uso na conservação da espécie *A. leiocarpa* é muito provável para a regeneração da espécie, auxiliando em mudas com crescimento acelerado, com maior sobrevivência no campo, contribuindo para o reflorestamento. São necessários mais estudos sobre as PGPR pois apresentam grande importância para o meio ambiente e que pode trazer uma maior sustentabilidade em diversos segmentos.

REFERÊNCIAS

ANITA, S. **Grápia, uma árvore ornamental com madeira de qualidade.** 2018. Disponível em: <https://www.queplantaeessa.com.br/grapia-apuleia-leiocarpa/>. Acesso em: 01/12/2021.

AWAIS, M.; TARIQ, M.; ALI, A.; QURBAN, A.; KHAN, A.; TABASSUM, B.; NASIR, I. A.; HUSNAIN, T. **Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 11, p. 12–321, 2017.

BATISTA, B. D.; LACAVA, P. T.; FERRARI, A.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; BONATELLI, M. L.; TSUI, S.; MONDIN, M.; KITAJIMA, E. W.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. **Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability.** Microbiological Research, v. 206, p. 33-42, 2018.

BERTOLDI, M. R.; DAMASCENO, A. T. de M. **A conservação da biodiversidade na amazônia e a governança transnacional ambiental: o programa áreas protegidas da Amazônia (arpa) e a experiência local com o parque nacional do cabo orange (pnco).** Revista de Direito da Cidade, v. 12, n. 4, p. 1-26, 2020.

BOMPADRE, M. J.; PÉRGOLA, M.; BIDONDO, L. F.; COLOMBO, R. P.; SILVANI, V. A.; PARDO, A. G.; OCAMPO, J. Á.; GODEAS, A. M. **Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungi capacity to alleviate abiotic stress of olive (*Olea europaea* L.) plants at different transplant conditions.** The Scientific World Journal, Bethesda, p. 12, 2014.

BRAGA, D. P. P.; RUSCHEL, A. R.; KANASHIRO, M.; VIDAL, E.; CRUZ, E. D.; MILÉO, R. C.; PORRO, R. **Árvores do manejo florestal no Projeto de Desenvolvimento Sustentável Virola-Jatobá, Anapu, PA.** Brasília, DF: Embrapa, p. 48-49, ed. 1, 2021.

CESA-LUNA, C.; BAEZ, A.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; LA CRUZ-ENRÍQUEZ, J.; CASTAÑEDA-ANTONIO, A. M.; MUÑOZROJAS, J. **The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens.** Acta Biológica Colombiana, v. 25, n. 1, p. 140-154, 2020.

CARDOSO, E. J. B. N.; ESTRADA-BONILLA, G. A. Inoculantes Agrícolas. *In*: ALTERTHUM, F.; SCHMIDELL, J.; MORAES, I.; LIMA, U. de A. (org.). **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e bioenzimáticos**, 2. ed. São Paulo: Blucher, 2019.

CARGNELUTTI, D.; BAMPI, E.; SANTIAGO, G. DE M; LUZ, V. C.; GARBIN, E.; CASTAMANN, A.; MOSSI, A. J. **Soluções tecnológicas emergentes para uma agricultura sustentável: microrganismos eficientes.** Agroecologia: princípios e fundamentos ecológicos aplicados na busca de uma produção sustentável / Luis Manuel Hernández García. Mérida Publishers, 2021.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Colombo: EMBRAPA/CNPR, Brasília, v. 1, p. 1039, 2003.

CASTRO, D. S. de; ARAUJO, E. F.; BORGES, E. E. de L.; AMARO, H. T. R. **Caracterização da testa de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.) após superação de dormência.** Ciência Florestal, v.27, n.3, p.1061-1068, 2017.

DELVAUX, J. C.; MIGUEL, P. S. B.; OLIVEIRA, M. N. V.; FRANCO, M. H. R.; CAMARGO, R.; BORGES, A. C. **Efeito da sazonalidade e disponibilidade de recursos sobre comunidades microbianas em solo de floresta de eucalipto.** Scientia Forestalis, v. 49, n. 130, p. 1-13, 2021.

FELIPPI, M.; MAFRA, C. R. B.; CANTARELLI, E. B.; ARAÚJO, M. M.; LONGHI, S. J. **Fenologia, Morfologia e Análise de Sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F Macbr.** Ciência Florestal, v. 22, n. 3, p. 477–491, 2012.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. **The diversity and biogeography of soil bacterial communities.** Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, Washington, v. 103, n. 3, p. 626–631, 2006.

GALINDO, F. S.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; BELLOTE, J. L. M.; SANTINI, J. M. K.; FILHOT.M. C. M. T.; BUZETTI, S. **Épocas de inoculação com Azospirillum brasilense via foliar afetando a produtividade da cultura do trigo irrigado.** Tecnol. & Ciên. Agropec., João Pessoa, v.9, n.2, p.43-48, 2015.

ÁRVORES DO BRASIL. **Garapa – *Apuleia leiocarpa*.** 2020. Disponível em: <https://www.arvores.brasil.nom.br/new/garapa/index.htm>. Acesso em: 01/12/2020.

HOFFMANN, R. B.; MOREIRA, É. E. A.; HOFFMANN, G. S. S.; ARAÚJO, N. S. F. **Efeito do manejo do solo no carbono da biomassa microbiana.** Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, v. 1, n.1, 2018.

IBÁ. **Sumário executivo da indústria brasileira de árvores: relatório 2019**, Brasília: IBÁ, p. 80, 2019. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>

JUNIOR, P. P.; SILVA, M. C. S.; PRADO, I. G. O.; SILVA, H. S.; SILVA, C. C.; KASUYA, M. C. M. **Como os microrganismos auxiliam na revegetação de áreas afetadas pelo desastre de mariana?** In Dia d do rio doce: Um olhar científico sobre o maior desastre socioambiental do Brasil / Org: VICENTE, N. M. F, SPERBER, C. F.; CARNEIRO, M. A. C. Lavras: UFLA, 2021.

LOPES, M. J. S.; SANTIAGO, B. S.; SILVA, I. N. B. da; GURGEL, E. S. C. **Microbial biotechnology: inoculation, mechanisms of action and benefits to plants**. Research, Society and Development, *[S. l.]*, v. 10, 2021a.

LOPES, M. J. S.; DIAS-FILHO, M. B.; GURGEL, E. S. C. **Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors**. Frontiers in Sustainable Food Systems, v. 5, 2021b.

LOUREIRO, M. B.; GONÇALVES, E. R. da.; ROSSETTO, C. A. V. **Avaliação do efeito do tamanho de sementes na germinação e no vigor de garapa (***Apuleia leiocarpa* **(Vog.) Macbr.).** Revista Univ. Rural. Seropédica, v. 24, n. 1, p. 73-77, 2004.

MATHEUS, A. C. C. **Sugestões para o alcance das dimensões da sustentabilidade dos conhecimentos tradicionais associados à biodiversidade amazônica.** Revista Sítio Novo, v. 4, n. 3, p. 175-187, 2020.

MEDEIROS, M. J. dos S.; SOUSA, R. L. de; OLIVEIRA, D. M. de; SILVA, A. P. A. da; LIMA, A. L. A. de. **Estabelecimento de** *Myracrodruon urundeuva* **Allemão com inoculação de micro-organismo sob diferentes condições de luminosidades.** Journal of Environmental Analysis and Progress, v. 02, n. 04, p. 482-492, 2017.

MOIN, S.; ALI, S. A.; HASAN, K. A.; TARIQ, A.; SULTANA, V.; ARA, J.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. **Managing the root rot disease of sunflower with endophytic fluorescent Pseudomonas associated with healthy plants.** Crop Protection, v. 130, p. 1-10, 2020.

NUNES, J. S.; ARAÚJO, A. S. F.; NUNES, L. A. P. L.; LIMA, L. M.; CARNEIRO, R. F. V.; SALVIANO, A. A. C.; TSAI, S. M. **Impact of land degradation on soil microbial biomass and activity in northeast Brazil.** Pedosphere, v. 22, n. 1, p. 88-95, 2012.

OLIVEIRA, P. A.; GIORDANI, I.; BARETTA, C. R. D. M. **Benefícios da microbiota do solo na agricultura.** Caderno rural, ed. 227, v. 11, 2019.

OTT, P. H.; BORDIN, J. **Planejamento para a Conservação da Biodiversidade: uma Abordagem Prática e Interdisciplinar de Ensino.** Biodiversidade Brasileira, v. 11, n. 3, p. 1-18, 2021.

PARRAY, J. A.; MIR, M. Y.; SHAMEEM, N. **Sustainable Agriculture: Biotechniques in Plant Biology.** Springer Nature, 2019.

PREININGER, C.; SAUER, U.; BEJARANO, A.; BERNINGER, T. **Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants.** Applied microbiology and biotechnology, v. 102, n. 17, p. 7265-7282, 2018.

QUECINE, M. C.; BATISTA, B. D.; LACAVA, P. T. **Diversity and biotechnological potential of plant-associated endophytic bacteria.** In: Kumar, P. Ananda.; Govil, J. N. Biotechnology: Plant Biotechnology, v. 2, p. 377-424, 2014

ROCHA, A. F. de S. **Diversidade funcional da microbiota endofítica e rizosférica de** *Hymenaea courbaril* **l. no cerrado e pantanal**. 2020. 84 f. Dissertação (em biodiversidade e conservação) – Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verda, 2020.

RODRIGUES, B. S. **Biodiversidade e desenvolvimento na Amazônia: uma Perspectiva do paradigma tecnológico da quarta revolução Industrial.** Revista do Instituto de Estudos Econômicos e Internacionais, v. 1, n. 4, p. 116-142, 2020.

TASKKA. **Mudas nativas e ornamentais lof,** Grápia – Viveiro, 2016. Disponível em: <http://www.mudasnativaslof.com.br/especies/detalhes/grapia>. Acesso em: 09/01/2021

TESTA, P. A.; FAVERO, L.; DE ROSA, K. R. **Biodiversidade: principais ameaças e alertas.** RETEC, Ourinhos, v. 13, n. 1, p. 29-34, 2020.

VIEIRA, L. **O rumo atual e a perda da biodiversidade no Brasil**. 2014. Disponível em: <https://www.oeco.org.br/colunas/colunistas-convidados/28642-o-rumo-atual-e-a-perda-da-biodiversidade-no-brasil/>. Acesso em: 14, abril, 2021.

YU, L.; SONG, M.; LEI, Y.; KORPELAINEN, H.; NIINEMETS, U.; LI, C. **Effects of competition and phosphorus fertilization on leaf and root traits of late-successional conifers** *Abies fabri* **and** *Picea brachytyla***.** Environmental and Experimental Botany, v. 162, p. 14–24, 2019.

SOBRE A ORGANIZADORA

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2000), com mestrado em Biologia Celular e Molecular (2002), doutorado em Ciências (2006) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o mestrado e o doutorado trabalhou diretamente com biologia celular e molecular e bioquímica, na clonagem e expressão de genes do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Também trabalhou com morte celular e estresse oxidativo no carrapato. Fez pós-doutorado na área de Ciências Médicas - Farmacologia (2007) na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Atualmente é professora e líder do Grupo de Estudos em Microbiologia e Parasitologia (NUEMP) no Departamento de Parasitologia e Microbiologia, e membro do Núcleo de Pesquisa em Prevenção e Controle de Infecções em Serviços de Saúde (NUPCISS) na Universidade Federal do Piauí. Também é docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem (PPGEnf-UFPI). Tem experiência nas áreas de Biologia Celular e Molecular, Imunologia, Parasitologia, Microbiologia e Farmacologia Experimental e tem linhas de pesquisa em Controle de Infecções em Serviços de Saúde, Infecções comunitárias e Educação em Saúde.

ÍNDICE REMISSIVO

A

C

E

F

I

K

L

M

P

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena
Editora
Ano 2022

MICROBIOLOGIA
BÁSICA E
APLICADA
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br
Atena
Editora
Ano 2022